



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

EVOLUÇÃO DA RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS EM *STAPHYLOCOCCUS* SPP. –  
1999 a 2006.

CLAUDIA RAQUEL OLIVEIRA MONCHIQUE

CONSTITUIÇÃO DO JURI:

Doutor Victor Manuel Diogo de Oliveira Alves  
Doutora Maria Constança Matias Ferreira Pomba  
Doutora Ana Mafalda Gonçalves Xavier Félix Lourenço

ORIENTADOR

Doutora Maria Constança Matias  
Ferreira Pomba

CO-ORIENTADOR

Doutor Nuno Manuel Mira Flor  
Santos Félix

2013

LISBOA

---





UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

EVOLUÇÃO DA RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS EM *STAPHYLOCOCCUS* SPP. –  
1999 a 2006.

CLAUDIA RAQUEL OLIVEIRA MONCHIQUE

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI:

Doutor Victor Manuel Diogo de Oliveira Alves

Doutora Maria Constança Matias Ferreira Pomba

Doutora Ana Mafalda Gonçalves Xavier Félix Lourenço

ORIENTADOR

Doutora Maria Constança Matias

Ferreira Pomba

CO-ORIENTADOR

Dr. Nuno Manuel Mira Flor

Santos Félix

2013

LISBOA

---

## **Agradecimentos**

Apesar de ser uma forma singela de agradecimento, a todas as pessoas aqui mencionadas fica o meu muito obrigado, de todo o coração.

Em primeiro lugar, àqueles com que sempre posso contar e que todos os dias são a minha fonte de inspiração e de vontade de ser a melhor Veterinária possível, aos meus pais e irmão.

A todos os animais que passaram, até agora, pela minha vida, em especial ao Black, à Nica, ao Brownie, ao Nico e à Ruca, e a todos aqueles que ainda virão e me ensinarão muitas lições de vida.

À professora Constança Pomba, pela paciência, simpatia e imediata disponibilidade em me ajudar nesta fase mais árdua do nosso belo curso. Ao professor Luís Telo da Gama, pela disponibilidade e amabilidade.

A todas as meninas do Laboratório de Resistências a Antibióticos e Biocidas, pela amabilidade com que me integraram na rotina diária do laboratório e por toda a sabedoria transmitida, e em especial à Natacha, pela pronta disponibilidade em me ajudar sempre que precisei, à paciência que dedicou à minha tese e às minhas crises de stress.

Aos médicos, enfermeiros e auxiliares do Hospital Escolar da FMV, por todo o conhecimento transmitido e por terem feito com que os meus seis meses de estágio fossem tão enriquecedores. Um especial obrigado ao Doutor Nuno Félix, por me ter feito sonhar com valores mais altos, desde o início do meu percurso na FMV, por ser um Médico Veterinário espetacular e por deixar plantado em mim o “bichinho” da Cardiologia e Urgências.

À espetacular turma C, sem ela a minha experiência académica teria sido, sem dúvida, bem mais tristonha, deixando um especial obrigado ao Beselga, ao Coelhoinho, à Mimi, Djems, Diana, Carolina, Raquel, Sofia, Catarina, Ana Rute e Joana Chaves.

Ao Nuno, Filipa e Joana, por aturarem a minha parvoíce há tanto tempo.

**OBRIGADO!**



## **Resumo – Evolução da resistência aos antibióticos em *Staphylococcus* spp. – 1999 a 2006.**

O género *Staphylococcus* tem importância a nível clínico e económico, sendo que a emergência de estirpes meticilina resistente e multirresistentes tornam-no num assunto atual em Medicina Humana e Veterinária. As 383 amostras de infeções clínicas analisadas foram recebidas pelo Laboratório de Análises Clínicas da FMV-UL ao longo de um período de 8 anos (1999-2006). O teste de susceptibilidade aos antibióticos foi realizado por difusão de disco usando 37 antibióticos. As espécies de estafilococos foram identificadas por amplificação por PCR dos respetivos genes *nuc*. Os genes *mecA* e *mecC* foram pesquisados por PCR. No total, 293 isolados foram resistentes a pelo menos um antibiótico (76,50%), com as maiores frequências de resistência à penicilina e ampicilina (53%). A maior percentagem de resistência a um antibiótico verificou-se em *S. pseudintermedius* (80,84%), seguido dos *S. aureus* (75%), estafilococos coagulase-negativo (ECN) (68,18%) e *S. schleiferi* (63,44%). Globalmente, 132 isolados foram multirresistentes (34,36%) e apenas 23,50% dos isolados foram suscetíveis a todos os antibióticos testados. A resistência aumentou com o tempo, sendo 2004 o ano com maior percentagem de isolados resistentes de estafilococos (85%). Dez isolados eram resistentes à oxacilina, mas só oito eram *mecA* positivo (sete ECN e um *S. aureus*) e nenhum foi positivo para o *mecC*. Os nossos resultados confirmam a elevada resistência aos antibióticos em estafilococos e ressaltam a importância de uma monitorização contínua dos padrões de resistência para ajustamento da estratégia antimicrobiana.

Palavras-chave: *Staphylococcus*, resistências, antibióticos



## **Abstract – Evolution in antibiotics resistance in *Staphylococcus* spp. – 1999 a 2006.**

The genus *Staphylococcus* has importance at clinical and economic level, with the emergence of methicillin-resistant and multiresistant strains making it a current issue in Human and Veterinary Medicine. The 383 clinical samples analyzed were received by the Laboratory of Clinical Analysis of the FMV-UL over a period of 8 years (1999-2006). The antimicrobial susceptibility testing was performed by disk diffusion using 37 antibiotics. *Staphylococcal* species were identified by PCR amplification of the respective *nuc* gene. The *mecA* and *mecC* genes were screened by PCR. In total, 293 isolates were resistant to at least one antibiotic (76,50%), with higher frequencies of resistance to penicillin and ampicillin (53%). The highest resistance to one antibiotic was found in *S. pseudintermedius* (80,84%) followed by *S. aureus* (75%), coagulase-negative staphylococci (CNS) (68,18%) and *S. schleiferi* (63,44%). Overall, 132 isolates were multidrug resistant (34,46%) and only 23,50% of the isolates were susceptible to all the antibiotics tested. Resistance increased over time, with the highest level observed in 2004 (85%). Ten isolates were resistant to oxacilin, but only 8 were *mecA*-positive (seven CNS and one *S. aureus*) and none was *mecC*-positive. Our results confirmed that antimicrobial resistance is very frequent in staphylococci, and highlights the importance of a continuous monitoring of the resistance patterns for adjustment of antimicrobial strategy.

Keywords: *Staphylococcus*, resistances, antibiotic





# Índice

<b>I. PREFÁCIO .....</b>	<b>1</b>
<b>II. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>2</b>
<b>1.1 CARACTERIZAÇÃO DO GÉNERO <i>STAPHYLOCOCCUS</i> .....</b>	<b>3</b>
<b>1.2 MODO DE AÇÃO DOS ANTIBIÓTICOS .....</b>	<b>4</b>
1.2.1 INIBIDORES DA SÍNTESE DA PAREDE CELULAR .....	4
1.2.2 INIBIDORES DA SÍNTESE PROTEICA .....	6
1.2.3 INIBIDORES DA SÍNTESE DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	12
1.2.4 ANTAGONISTAS METABÓLICOS .....	14
<b>1.3 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA BACTERIANA .....</b>	<b>15</b>
1.3.1 RESISTÊNCIA AOS B-LACTÂMICOS.....	17
1.3.2 RESISTÊNCIA AOS GLICOPÉPTIDOS.....	18
1.3.3 RESISTÊNCIA AOS AMINOGLICOSÍDEOS .....	20
1.3.4 RESISTÊNCIA À TETRACICLINAS.....	20
1.3.5 RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS MLS (MACRÓLIDOS, LINCOSAMIDAS E ESTREPTOGRAMINAS).....	23
1.3.6 RESISTÊNCIA AO ÁCIDO FUSÍDICO.....	25
1.3.7 RESISTÊNCIA À MUPIROCINA .....	25
1.3.8 RESISTÊNCIA AOS FENICÓIS .....	26
1.3.9 RESISTÊNCIA À LINEZOLIDA.....	26
1.3.10 RESISTÊNCIA À NITROFURANTOÍNA.....	27
1.3.11 RESISTÊNCIA ÀS QUINOLONAS .....	27
1.3.12 RESISTÊNCIA À RIFAMPICINA .....	28
1.3.13 RESISTÊNCIA AO TRIMETOPRIM, SULFONAMIDAS E ASSOCIAÇÕES.....	28
<b>1.4 SITUAÇÃO ATUAL DA RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS EM <i>STAPHYLOCOCCUS</i> SPP. EM ANIMAIS E HUMANOS.....</b>	<b>29</b>
1.4.1 SITUAÇÃO MUNDIAL.....	30
1.4.2 EM PORTUGAL.....	30
<b>III. PROJETO DE INVESTIGAÇÃO: EVOLUÇÃO DA RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS EM <i>STAPHYLOCOCCUS</i> SPP. ENTRE 1999 E 2006 .....</b>	<b>31</b>
<b>1.1 OBJETIVOS.....</b>	<b>31</b>
<b>1.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
1.2.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA .....	31
1.2.2 EXTRAÇÃO DE ADN .....	32
1.2.3 POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) .....	32
1.2.4 TESTE DE SUSCETIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS .....	33
1.2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	34

<b>1.3 RESULTADOS.....</b>	<b>34</b>
1.3.1 DESCRIÇÃO DA AMOSTRA .....	34
1.3.2 CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA NO GERAL.....	36
1.3.3 EVOLUÇÃO DA RESISTÊNCIA ENTRE 1999 E 2006.....	38
1.3.4 CARACTERIZAÇÃO DA RESISTÊNCIA POR GRUPO DE ANTIBIÓTICOS .....	41
1.3.5 IDENTIFICAÇÃO DE FATORES DE RISCO.....	44
1.3.6 CORRELAÇÃO ENTRE RESISTÊNCIAS A DIFERENTES ANTIBIÓTICOS.....	45
1.3.7 DETECÇÃO DE MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS B-LACTÂMICOS (GENES <i>MECA</i> E <i>MECC</i> ).....	45
<b>1.4 DISCUSSÃO .....</b>	<b>46</b>
<b>1.5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>52</b>

#### **IV. BIBLIOGRAFIA.....**

#### **Anexos**

Anexo 1 – Resumo aceito no 3 <sup>rd</sup> ASM-ESCMID Conference on Methicillin-resistant Staphylococci in Animals: Veterinary and Public Health Implications .....	62
Anexo 2 – Distribuição dos isolados que compõem o grupo de estafilococos coagulase-negativo (ECN). .....	63
Anexo 3 – Percentagens de isolados suscetíveis e de isolados resistentes aos diferentes antibióticos estudados ao longo dos anos.....	65
Anexo 4 – Coeficiente de correlação de Kendall para os grupos de antibióticos testados.....	67

#### **Índice de figuras**

Figura 1 – Principais mecanismos de ação dos agentes antimicrobianos (adaptado de Anvisa, 2007)...	4
Figura 2 – Locais de ação dos vários antibióticos inibidores da síntese proteica sobre o ribossoma (adaptado de McDermott et al., 2003).....	7
Figura 3 – Mecanismo de ação das oxazolidinonas (adaptado de Livermore, 2003).....	11
Figura 4 – Diferentes mecanismos de resistência às tetraciclínas (adaptado de Speer, Shoemaker & Salyers, 1992).....	21

#### **Índice de tabelas**

Tabela 1 – Principais membros da família das tetraciclínas, ano de descoberta e via de administração (adaptado de Chopra & Roberts, 2001).....	8
Tabela 2 – Efeito na CIMs da associação trimetoprim-sulfametoxazol, em proporção de 1 para 20, em alguns isolados clínicos (Bushby S. M., 1975).....	15

Tabela 3 – Genes de resistência a antimicrobianos e resistência que codificam em estirpes do GSI (adaptado de Kadlec & Schwarz, 2012).....	16
Tabela 4 – PLPs associadas a resistências em bactérias com importância clínica (adaptado de Georgopapadakou, 1993). ....	17
Tabela 5 – Mecanismos de resistência mediado pelos genes tet e otr (adaptado de Roberts, 2005).....	22
Tabela 6 – Distribuição das amostras estudadas pelas espécies de estafilococos em estudo e por ano.	36
Tabela 7 – Distribuição da suscetibilidade e da resistência, em frequência e percentagem, das diferentes espécies de estafilococos estudados. ....	37
Tabela 8 – Distribuição global das resistências obtidas a 33 antibióticos testados, em frequência e em percentagem. ....	37
Tabela 9 – Resultado do PCR para detecção dos genes mecA e mecC. ....	45

## Índice de gráficos

Gráfico 1 – Frequência do local de recolha das amostras. ....	35
Gráfico 2 – Frequência da distribuição de espécies presentes na amostra. ....	35
Gráfico 3 – Percentagem de isolados resistentes a pelo menos um antibiótico e de isolados resistentes a três ou mais antibióticos de grupos diferentes.....	36
Gráfico 4 – Evolução da frequência de isolados resistentes a pelo menos um antibiótico e de isolados resistentes a três ou mais antibiótico de grupos diferentes, por ano.....	38
Gráfico 5 – Frequência de isolados resistentes a pelo menos um antibiótico, por ano estudado. ....	40
Gráfico 6 – Frequência de isolados estudados resistentes a três ou mais antibióticos de grupos diferentes, por ano estudado.....	40
Gráfico 7 – Frequência de resistências das 4 espécies estudadas, aos $\beta$ -lactâmicos.....	41
Gráfico 8 – Frequência de resistências das 3 espécies estudadas, às quinolonas.....	41
Gráfico 9 – Frequência de resistências das quatro espécies estudadas, à tetraciclina.....	42
Gráfico 10 – Frequência de resistências das quatro espécies estudadas, ao cloranfenicol.....	42
Gráfico 11 – Frequência de resistências das 4 espécies estudadas, aos aminoglicosídeos, à eritromicina e à clindamicina.....	43
Gráfico 12 – Percentagens de resistências das 4 estirpes estudadas, às sulfonamidas, trimetoprim e associação sulfametoxazol/trimetoprim. ....	43
Gráfico 13 – Frequência de resistências das 4 espécies estudadas, à nitrofurantoína, ácido fusídico, mupirocina, teicoplanina, linezolid, quinupristina/dalfopristina e rifampicina .....	44
Gráfico 14 – Relação entre o fenótipo de resistência à penicilina e ampicilina e o aparecimento de estirpes com o gene mecA.....	46

## **Abreviaturas**

ACC - Acetiltransferase

ADN – Ácido desoxirribonucleico

AK – Amicacina

AMC – Amoxicilina/Ácido clavulânico

AMP – Ampicilina

ANT – Adeniltransferase

APH – Fosfotranferase

ARN – Ácido ribonucleico

C – Cloranfenicol

CIM – Concentração inibitória mínima

CIP – Ciprofloxacina

CN – Gentamicina

CRO – Ceftriaxona

CTX – Cefotaxima

CVN – Cefovecina

DA – Clindamicina

DHFR – Dihidrofolato redutase

DHPS – Dihidropteroato sintetase

dNTP's – Deoxirribonucleótidos

E – Eritromicina

ECN – Estafilococos coagulase-negativo

ENR – Enrofloxacin

EUA – Estados Unidos da América

F – Nitrofurantoína

FD – Ácido Fusídico

FFC – Florfenicol

fMET – Formil-metionina

FMV – Faculdade de Medicina Veterinária

FOX - Cefoxitina

FR – Frequência relativa

GISA – *Staphylococcus aureus* intermédios aos glicopéptidos

GSI – Grupo de *Staphylococcus intermedius*

ITU – Infecções do trato urinário

K – Canamicina

KF – Cefalotina

LEV – Levofloxacina

LZD – Linezolid

mARN – Ácido ribonucleico mensageiro

MRS – Estafilococos resistentes à meticilina

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

MSSA – *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina

MRSP – *Staphylococcus pseudintermedius* resistente à meticilina

MUP – Mupirocina

MXF – Moxifloxacina

N – Neomicina

NET – Netilmicina

NOR – Norfloxacina

OFX – Ofloxacina

OX – Oxacilina

P – Penicilina

PABA – ácido p-aminobenzóico

PLPs – Proteínas de ligação à penicilina

PCR – *Polymerase chain reaction*

QD – Quinupristina/Dalfopristina

rARN – Ácido ribonucleico ribossomal

RD – Rifampicina

S – Estreptomicina

SCC*mec* – Cassete cromossomal *mec* de estafilococos

SXT – Trimetoprim/Sulfametoxazole

S3 – Sulfamidas

tARN – Ácido ribonucleico de transporte

TE – Tetraciclina

TEC – Teicoplanina

TOB – Tobramicina

TSA – Teste de suscetibilidade a antibióticos

VA – Vancomicina

VISA – *Staphylococcus aureus* intermédio à vancomicina

VRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina

W – Trimetoprim







## **I. Prefácio**

Em Setembro de 2012, iniciei o meu estágio de final de curso no Hospital Escolar da FMV, estágio esse com uma duração de 6 meses, e que perfiz perto de 1200 horas de estágio. Tive a oportunidade de rodar entre vários serviços, nomeadamente medicina interna, imagiologia, cirurgia e internamento. Na medicina interna, o trabalho do estagiário passava pelo acompanhamento de consultas, iniciando a mesma e recolhendo a anamnese do paciente e o estímulo iatrotrópico que levou com que os donos se encaminhassem até ao hospital, sendo de seguida feito o acompanhamento da consulta pelo médico responsável e efetuado o tratamento adequado. No serviço de imagiologia, foi possível contactar com os mais diversos meios de diagnóstico imagiológicos, entre eles o raio X, a tomografia axial computadorizada, a ecografia e a endoscopia. Neste serviço, o estagiário tinha oportunidade de acompanhar o exame e a sua interpretação pelo médico responsável, e nas ocasiões em que era necessário proceder à anestesia do animal, o estagiário procedia à sua cateterização, intubação e preparação do agente anestésico, ficando depois responsável pela monitorização da anestesia. Na cirurgia, o estagiário era responsável por receber o paciente e interná-lo, procedendo à sua sedação e analgesia sob indicação do médico responsável. Durante a cirurgia, o estagiário podia ou ser ajudante do cirurgião, tendo a possibilidade de contactar de perto com as mais diversas técnicas cirúrgicas, ou ficar responsável pela monitorização dos sinais vitais do paciente e da anestesia. No internamento, onde eram efetuados turnos de 24 horas, o estagiário era responsável pelo bem-estar dos pacientes, incluindo a sua higiene, alimentação, monitorização de sinais vitais e administração de medicações.

Em Maio de 2013, tive a oportunidade de iniciar um novo estágio que culminou com a escrita deste tema de tese, no Laboratório de Resistências a Antibióticos e Biocidas da FMV. O trabalho efetuado, que teve a duração aproximada de 3 meses, envolveu a interação com técnicas com as quais não tinha tido a oportunidade de contactar com tanta frequência enquanto estudante, como a *Polymerase Chain Reaction* (PCR), a extração de ADN, o Teste de Suscetibilidade a Antibióticos (TSA) e a Eletroforese.

## II. Introdução

A resistência bacteriana a agentes antimicrobianos é um tema em constante crescimento e de importância tanto para a saúde animal como para a saúde pública. Na prática clínica, para que haja uma otimização da terapêutica antimicrobiana do paciente, cada vez mais se salienta a importância da correta determinação da suscetibilidade de um isolado aos antibióticos, tendo em conta o aumento do número de resistências e de microrganismos multirresistentes (Fluit, Visser & Schmitz, 2001). Devido à sua flexibilidade no tipo e número de antibióticos que podem ser testados, o teste de suscetibilidade a antibióticos (TSA) pelo método de difusão de disco tem sido o mais usado em Medicina Veterinária (Prescott, Baggot & Walker, 2000). Este teste usa a dimensão de halos formados pela difusão de um agente antimicrobiano numa placa em que estão presentes colónias em crescimento do isolado clínico para determinar a sua suscetibilidade ou resistência a esse agente, sendo que a principal desvantagem deste método é o facto de os seus resultados serem qualitativos (Prescott et al., 2000). A interpretação deste teste deve ser crítica e cuidadosa, pois se em alguns casos a presença de um gene de resistência é altamente preditivo para o desfecho clínico de uma terapêutica antimicrobiana (ex: gene *mecA*), noutros a presença desse gene não leva necessariamente a falha no tratamento (ex: gene *AmpC*), dependendo do nível de expressão do gene (Milatovic & Braveny, 1987). O género *Staphylococcus* é de grande importância em Medicina Veterinária, tanto a nível clínico como económico. Infecções por estafilococos são causadoras de perdas económicas em animais de produção: em bovinos é frequentemente encontrado em mastites e doenças granulomatosas; em suínos surge principalmente doenças cutâneas como o impetigo; em ovinos, piodermites; e em aves de produção podem causar septicémias agudas (Couter & Galton, 1962). *S. pseudintermedius* é considerado o principal causador de piodermite em cães (Rich, 2005). A capacidade que os estafilococos apresentam para se tornarem resistentes a uma grande variedade de antibióticos é uma das suas características mais alarmantes (Weese & van Duijkeren, 2010). A emergência de estirpes de *Staphylococcus* spp. meticilina resistente e multirresistentes tornam este assunto extremamente atual e importante tanto em Medicina Humana como em Medicina Veterinária. Para uma melhor compreensão deste tema segue-se uma pequena revisão acerca das características gerais e particularidades das espécies mais importantes em Medicina Veterinária do género *Staphylococcus* e igualmente os mecanismos de ação dos antibióticos e mecanismos de resistência a esses mesmos antibióticos.

## 1.1 Caracterização do gênero *Staphylococcus*

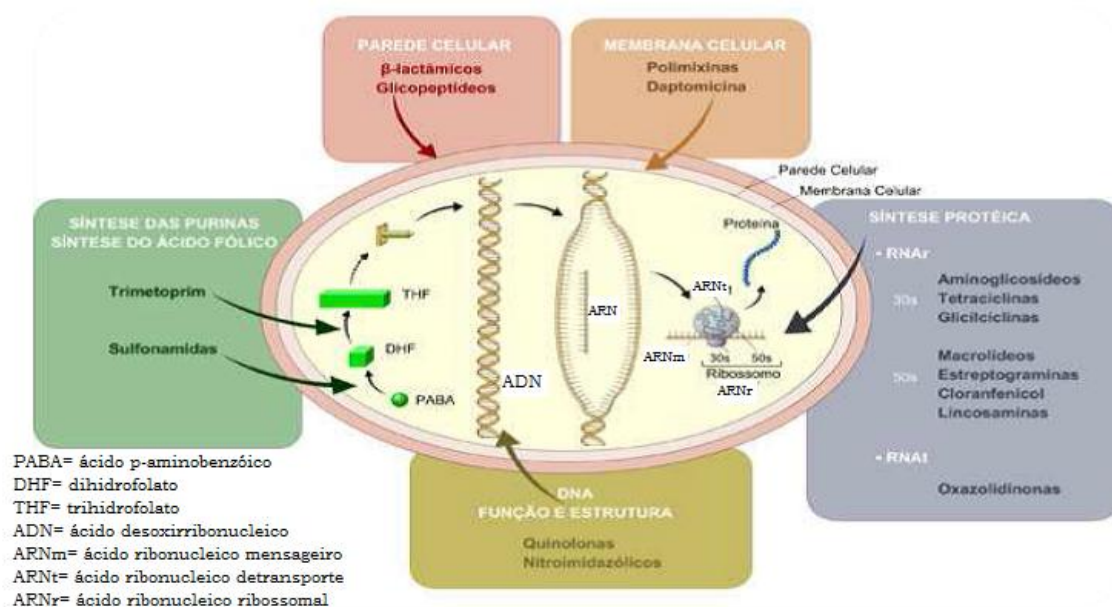
Os membros do gênero *Staphylococcus* são cocos Gram-positivo anaeróbias facultativas, não móveis, catalase positivo, oxidase negativo, fermentadoras de glucose e são encontradas na pele e mucosas de animais de sangue quente (Willey, Sherwood & Woolverton, 2008). Possuem uma parede celular sob a forma de uma monocamada justaposta à membrana celular (Willey et al., 2008), permeável à passagem de macromoléculas, não oferecendo, por isso, resistência à difusão de antibióticos (Sousa, 2006). Pode ser encontrada em algumas estirpes de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* uma camada externa de polissacáridos, facilitadora da aderência a alguns tecidos corporais, formando biofilmes e diminuindo a eficácia dos antibióticos (Sousa, 2006). O gênero *Staphylococcus* é composto por vários agentes patogênicos oportunistas com importância em Medicina Veterinária, sendo que os coagulase-positivo *Staphylococcus aureus* e os membros do grupo de *Staphylococcus intermedius* (GSI) são os de maior importância na prática clínica (Weese & van Duijkeren, 2010). Outro estafilococo coagulase-positivo com importância em clínica, o *Staphylococcus schleiferi*, em especial a subespécie *coagulans*, é encontrado em otites externas de cães e gatos (Igimi, Takahashi & Mitsuoka, 1990). Dentro do GSI, que é composto por *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus intermedius* e *Staphylococcus delphini*, o primeiro é o mais frequentemente associado a infecções em várias espécies de animais, mas principalmente em cães (Kadlec & Schwarz, 2012). Até há bem pouco tempo, o *S. intermedius* era visto como o agente deste gênero de bactérias mais comum em cães, sendo que só recentemente foi demonstrado que isolados identificados como *S. intermedius* eram afinal *S. pseudintermedius* (De Lucia et al., 2011). Em 1976 foi documentada pela primeira vez a estirpe *Staphylococcus intermedius* como parte da microbiota normal de pele e mucosas de cães e gatos (Cox et al., 1988), podendo ocorrer, também, em cavalos, cabras, raposas e guaxinis (Weese & van Duijkeren, 2010). As regiões corporais mais frequentemente colonizadas por este agente são a cavidade nasal e a região anal, embora possa igualmente ser encontrado na boca e órgãos genitais de animais saudáveis assim como em animais com doenças inflamatórias de pele (Griffeth, Morris, Abraham, Shofer & Rankin, 2008). O *S. pseudintermedius* tem sido apontado como o principal causador de piodermites em cães, estando também associado a infecções urinárias e otites, principalmente em cães. Apesar de mais raramente, pode igualmente causar infecção em gatos e humanos (Weese & van Duijkeren, 2010). A importância do *S. pseudintermedius* como agente zoonótico é menor do que a do *S. aureus*, isto porque a colonização de humanos por *S. pseudintermedius* é pouco comum, mesmo em indivíduos que contatem diretamente com animais (Weese & van Duijkeren, 2010). Contudo, foram recentemente descritos casos de infecção por

*Staphylococcus pseudintermedius* resistentes à metilicilina (MRSP) em humanos, através de contacto com cães, na Suíça (Stegmann, Burnens, Maranta & Perreten, 2010), e Itália (Savini et al., 2013). *S. aureus* é geralmente uma bactéria comensal que pode ser encontrada em várias espécies de animais, principalmente no homem, sendo que entre 29 e 38% da população humana é portadora desta estirpe na cavidade nasal (Weese, 2005).

## 1.2 Modo de ação dos antibióticos

Os antibióticos são compostos que inibem seletivamente enzimas que, ou são únicas das células procariotas ou que, apesar de existirem também nas células dos mamíferos, são suficientemente diferentes para que não ocorra toxicidade marcada no hospedeiro (McDermott, Walker & White, 2003). Os principais modos de ação envolvem interferência com a síntese da parede celular bacteriana, inibição da síntese proteica, em diferentes momentos dependendo do fármaco, inibição da síntese de ácidos nucleicos ou antagonismo metabólico, como se pode ver ilustrado na figura 1.

Figura 1 – Principais mecanismos de ação dos agentes antimicrobianos (adaptado de Anvisa, 2007).



### 1.2.1 Inibidores da síntese da parede celular

São dos grupos de antibióticos mais seletivos, por terem como alvo de atuação uma estrutura, o peptidoglicano, que apenas existe nas células procariotas e não nas eucariotas. Fazem parte fármacos como os β-lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenemos e monobactams) e glicopéptidos (Willey et al., 2008). A síntese do peptidoglicano faz-se em 4 fases: 1) síntese

do precursor no citoplasma; 2) transporte do precursor através da membrana; 3) deposição de glicanos na parede celular; e 4) ligação e maturação. Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e os glicopéptidos, os mais usados do grupo dos inibidores da síntese da parede celular, atuam nas fases 3 e 4 da síntese do peptidoglicano (McDermott et al., 2003).

#### 1.2.1.1 $\beta$ -lactâmicos

A bioatividade deste grupo de fármacos deve-se ao seu anel  $\beta$ -lactâmico, que tem a capacidade de se ligar a alvos específicos na membrana citoplasmática, as proteínas de ligação às penicilinas (PLPs) (Malouin & Bryan, 1986). Estas PLPs apesar de estarem presentes em todas as bactérias, variam em número, quantidade, tamanho e afinidade para os  $\beta$ -lactâmicos (Georgopapadakou, 1993). As PLPs com maior peso molecular, que funcionam como transpeptidases na síntese do peptidoglicano e que controlam processos como o crescimento e divisão celular são consideradas essenciais, sendo que num organismo existem 2 a 4 PLPs essenciais. A sua inibição leva a morte celular ou paragem do crescimento (Georgopapadako, 1993). No entanto, para terem efeito, os  $\beta$ -lactâmicos têm de atuar em células em crescimento (Lederberg & Zinder, 1948). Deste grupo faz parte o primeiro antibiótico descoberto, a penicilina, e desde aí estes fármacos têm sido largamente utilizados a nível mundial (Ogawara, 1981). Nos anos 60, ocorreu a maior expansão deste grupo de antibióticos, com a introdução de penicilinas e cefalosporinas semi-sintéticas, com a meticilina a constituir a primeira penicilina semi-sintética estável às  $\beta$ -lactamases, enzimas produzidas por estafilococos que degradam os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (Rolinson, 1998). Devido ao aparecimento destas  $\beta$ -lactamases como mecanismos de resistência, foi necessária a introdução, nos anos 80, de novos  $\beta$ -lactâmicos, com maior estabilidade àquelas enzimas, como novas cefalosporinas, os carbapenemos e monobactamos (Philippon, Arlet & Jacoby, 2002).

#### **Penicilinas**

As penicilinas podem ser naturais, como a penicilina G e V, ativas contra a maioria das bactérias Gram-positivo como estreptococos e estafilococos (Willey et al., 2008), ou sintéticas, possuindo resistência às  $\beta$ -lactamases, como é o caso da meticilina, com fraca atividade para as Gram-negativo, mas especialmente ativa contra Gram-positivo (Sousa, 2006).

#### **Cefalosporinas**

São um grupo de antibióticos que foram pela primeira vez isolados de fungos do género *Cephalosporium* em 1948 (Willey et al., 2008). Possuem um espectro mais alargado do que a penicilina G, inativando tanto bactérias Gram-positivo como Gram-negativo (Sousa, 2006). Existem 4 gerações de cefalosporinas, sendo que as de 1ª geração possuem atividade apenas contra bactérias Gram-positivo, mesmo os produtores de  $\beta$ -lactamases; os de 2ª geração são também ativos contra bactérias Gram-negativo produtores de  $\beta$ -lactamases; os de 3ª geração têm a vantagem de poderem ser administrados via oral e os de 4ª geração são os mais estáveis contra  $\beta$ -lactamases (Sousa, 2006).

#### 1.2.1.2 Glicopéptidos

Dentre os vários glicopéptidos, a vancomicina e a teicoplanina têm lugar de destaque, visto serem atualmente os antibióticos de recurso para o tratamento de infeções por *Staphylococcus aureus* metilicina-resistente (MRSA) em Medicina Humana (Johnson, Uttley, Woodford & Roberts, 1990). A primeira foi descoberta em 1956 a partir de culturas de *Streptomyces orientalis*, e logo despertou o interesse dos investigadores devido ao seu efeito contra estirpes de estafilococos. Seguiu-se a descoberta da segunda, alguns anos mais tarde a partir de *Streptomyces teichomyceticus* (Johnson et al., 1990). Estes antibióticos possuem um mecanismo de ação semelhante: interagem com o grupo D-alanil-D-alanina terminal presente na cadeia lateral do pentapeptido precursor do peptidoglicano, levando à inibição da síntese do peptidoglicano, logo interferindo na síntese da parede celular (Johnson, Uttley, Woodford & George, 1990). Os glicopéptidos têm ação limitada às bactérias Gram-positivo, visto que a camada de peptidoglicano das bactérias Gram-negativo está protegida por uma membrana externa e logo não consegue ser alcançada por estas moléculas (Fluit et al., 2001).

São bactericidas contra *Staphylococcus* spp. e alguns membros dos géneros *Clostridium*, *Bacillus*, *Streptococcus* e *Enterococcus* (Willey et al., 2008).

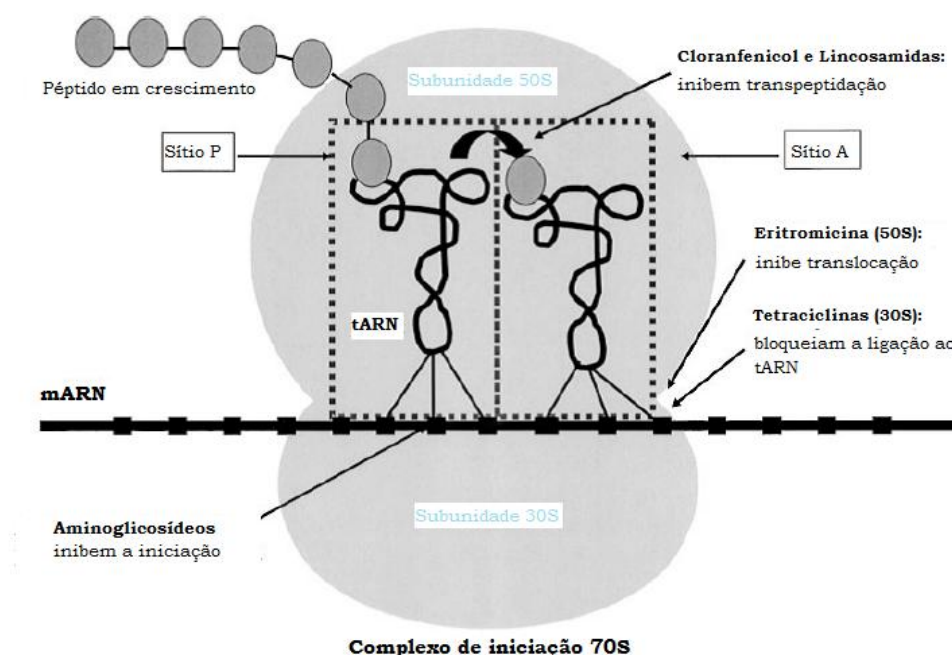
#### **1.2.2 Inibidores da síntese proteica**

Estes antibióticos atuam principalmente por interação com um local de ligação no ribossoma bacteriano, uns ligando-se à subunidade menor do ribossoma, a 30S, e outros à subunidade maior, a 50S. Desta forma, podem interferir com vários passos da via metabólica que leva à síntese de proteínas (Willey et al., 2008). A síntese proteica ocorre em 2 passos principais:

1) Transcrição, onde o ácido desoxirribonucleico (ADN) vai ser transcrito para ácido ribonucleico mensageiro (mARN), passo que é mediado pela enzima ARN polimerase (Sousa, 2006); 2) Tradução, que requer a presença do enzima aminoacil-tARN sintetase, que promove a ligação do ARN de transporte (tARN) a um aminoácido específico (Sousa, 2006). A

tradução processa-se em 3 fases: iniciação em que, no ribossoma, ocorre a ligação da subunidade 30S ao codão de iniciação do mARN. O tARN que transporta a fMET (formil-metionina) junta-se a este complexo no local P da cadeia peptídica em crescimento e a subunidade 50S liga-se à 30S para formar o complexo de iniciação 70S; a próxima fase é o alongamento, onde o tARN correspondente ao próximo codão liga-se ao local A do ribossoma; há depois a movimentação da cadeia em crescimento para o local P e fica o local A livre para o próximo tARN, num processo chamado translocação (McDermott et al., 2003); a cadeia peptídica vai crescendo até aparecer um codão de finalização no local A do ribossoma, ao qual não corresponde nenhum tARN, terminando assim a translocação e dá-se a libertação do péptido (Sousa, 2006). A figura 2 ilustra, de um modo geral, os locais de ação dos vários antibióticos inibidores da síntese proteica sobre o ribossoma.

Figura 2 – Locais de ação dos vários antibióticos inibidores da síntese proteica sobre o ribossoma (adaptado de McDermott et al., 2003).



#### 1.2.2.1 Aminoglicosídeos

A história dos aminoglicosídeos começa com a descoberta da estreptomicina, em 1944, sendo seguida da introdução de outros fármacos, como a canamicina, a gentamicina e a tobramicina. Nos anos 70 surgiu a necessidade da introdução de formas sintéticas deste grupo de antibióticos para combater as resistências já desenvolvidas, surgindo a amicacina e a netilmicina (Mingeot-Leclercq, Glupczynski & Tulkens, 1999). A ação dos aminoglicosídeos passa pela ligação à subunidade 30S do ribossoma bacteriano, o que impede o alongamento da



nova cadeia peptídica, por má leitura e/ou paragem precoce da tradução (Melancon, Tappich & Brakier-Gingras, 1992). Isto porque a ligação dos aminoglicosídeos ao ribossoma provoca uma alteração conformacional desse local, afetando a interação entre este e o tARN e resultando numa interação codão-anticodão anormal (Kotra, Haddad & Mobashery, 2000). Acrescentar a seguir ao ponto final: Mais ainda, alguns aminoglicosídeos podem interferir com a síntese proteica logo no seu início, impedindo a formação de um complexo de iniciação funcional (McDermott et al., 2003). Este grupo de antibióticos apresenta forte atividade contra *S. aureus* e bacilos Gram-negativo aeróbios, com a estreptomicina e a canamicina a serem que apresentam espectro de ação mais reduzido, e a amicacina o que possui melhor atividade devido à maior resistência aos enzimas bacterianos (Sousa, 2006).

#### 1.2.2.2 Tetraciclinas

São uma família de antibióticos descoberta nos anos 40 (Chopra & Roberts, 2001), sendo a clortetraciclina a primeira tetraciclina a ser descoberta, em 1948, a partir de culturas de *Streptomyces aureofaciens* (Sousa, 2006). São antibióticos de largo espectro, possuindo atividade bacteriostática tanto contra bactérias Gram-positivo como contra Gram-negativo aeróbios e anaérobios facultativos e até mesmo contra anaérobios estritos (Willey et al., 2008). Na tabela 1 é possível encontrar algumas das moléculas deste grupo, o seu ano de descoberta e possíveis vias de administração.

Tabela 1 – Principais membros da família das tetraciclinas, ano de descoberta e via de administração (adaptado de Chopra & Roberts, 2001).

Nome genérico	Ano de descoberta	Via de administração
<b>Clortetraciclina</b>	1948	Oral
<b>Oxitetraciclina</b>	1948	Oral e parental
<b>Tetraciclina</b>	1953	Oral
<b>Demetilclortetraciclina</b>	1957	Oral
<b>Rolitetraciclina</b>	1958	Oral
<b>Limeciclina</b>	1961	Oral e parental
<b>Clomociclina</b>	1963	Oral
<b>Metaciclina</b>	1965	Oral
<b>Doxiciclina</b>	1967	Oral e parental
<b>Minociclina</b>	1972	Oral e parental

O mecanismo de ação das tetraciclinas passa pela entrada na célula, ligação ao ribossoma e consequente paragem da síntese proteica (Speer, Shoemaker & Salyers, 1992). Para efetuarem a sua ação, as tetraciclinas necessitam de uma concentração intracelular efetiva. Já dentro da célula, tal como os aminoglicosídeos, vão inibir a síntese proteica ao atuar na subunidade 30S do ribossoma, por interferência com a ligação do aminoacilo tARN ao local de ligação no ribossoma (Schnappinger & Hillen, 1996).

#### 1.2.2.3 Macrólidos

Os macrólidos são, por norma, reunidos em três grupos, consoante o número de átomo que possuem no anel lactónico: o grupo 14, de que fazem parte antibióticos como a eritromicina e a claritromicina, o grupo 15 da azitromicina, e o grupo 16, onde encontramos a espiramicina e a miocamicina (Sousa, 2006). Parecem ter ação tanto contra cocos como bacilos Gram-positivo e, em menor extensão, contra cocos Gram-negativo (Leclercq & Courvalin, 1991). Estes antibióticos pertencem a uma família designada MLS (Macrólidos, Lincosamidas e Estreptograminas), cujos membros possuem mecanismo de ação e mecanismos de resistência bacteriana semelhantes, que passa pela inibição da subunidade 50S do ribossoma, impedindo a translocação durante a fase da tradução (Sousa, 2006).

#### 1.2.2.4 Lincosamidas

A lincomicina e a clindamicina são as duas lincosamidas com maior utilização na prática clínica. A primeira foi obtida a partir de culturas de *Streptomyces lincolnensis* e a segunda surgiu por modificação da primeira, sendo um antibiótico semi-sintético. Entre as duas, a clindamicina é a que apresenta melhor absorção e potência (Sousa, 2006). Apesar de ter atividade contra outros organismos, é útil, principalmente, contra anaeróbios estritos (Leclercq & Courvalin, 1991). Por pertencer ao grupo dos antibióticos MLS, o seu efeito bacteriostático envolve atuação sobre a subunidade 50S impedindo a translocação/transpeptidação, tal como acontece nos macrólidos (Sousa, 2006).

#### 1.2.2.5 Estreptograminas

Com o aumento da incidência de estirpes resistentes a vários antibióticos por todo o mundo, surgiu a necessidade da introdução no mercado de novas associações (Rubinstein & Bompart, 1997). A primeira estreptogramina a ser introduzida na clínica foi a pristinamicina, produzida pela bactéria *Streptomyces pristinaespiralis*. Uma das formas que já foi das mais utilizadas, mas que atualmente caiu em desuso em Medicina Humana, é uma associação de duas estreptograminas, uma A e outra B, a dalfopristina e a quinupristina, respetivamente (Sousa,

2006), numa proporção de 30% de quinupristina e 70% de dalfopristina (Leclercq, Nantas, Soussy & Duval, 1992; Lamb, Figgitt & Faulds, 1999).

A quinupristina e a dalfopristina ligam-se em sítios sequenciais na subunidade 50S do ribossoma da bactéria: a ligação da dalfopristina causa uma modificação conformacional no ribossoma que tem como consequência o aumento da afinidade da quinupristina (Cocito, Di Giambattista, Nyssen & Vannuffel, 1997; Lamb, et al., 1999). Como primeira estreptogramina injetável, a associação quinupristina/dalfopristina estende o seu espectro de ação antibacteriano, sendo eficaz contra uma larga variedade de bactérias Gram-positivo aeróbias e anaeróbias, incluindo MRSA (Low & Nadler, 1997). Quando separadas, cada uma destas estreptograminas são bacteriostáticas, enquanto em sinergia são rapidamente bactericidas para a maioria das bactérias Gram-positivo (Bouanchaud, 1992; Pankuch, Jacobs & Applebaum, 1995).

#### 1.2.2.6 Ácido fusídico

É um antibiótico esteróide com espectro de ação limitado, que tem vindo a ser utilizado desde o início dos anos 60, altura em que foi pela primeira vez obtido a partir de culturas de *Fusidium coccineum* (Verbist, 1990). É ativo contra bactérias Gram-positivo, principalmente *S. aureus*, mas com praticamente atividade nula contra bactérias Gram-negativo (Sousa, 2006). Assim, tem indicação quase exclusiva para o tratamento de infeções por estafilococos, incluindo infeções sistémicas por MRSA e tratamento da dermatite atópica (Dobie & Gray, 2004). A sua ação verifica-se ao nível da subunidade 50S do ribossoma (Sousa, 2006). O ácido fusídico liga-se à proteína factor G de alongamento, estabilizando a ligação ribossoma – factor G de alongamento e inibindo a ligação do aminoacilo tARN ao ribossoma, impedindo a continuação da síntese proteica (Richmann & Bodley, 1972)

#### 1.2.2.7 Mupirocina

Foi obtido a partir de *Pseudomonas fluorescens*, usado principalmente como agente tópico, com particular atividade contra *S. aureus*, incluindo estirpes MRSA (Sutherland et al., 1985). É um antibiótico bacteriostático, podendo ter atividade bactericida em condições de pH semelhante ao de algumas zonas da pele (Cookson, 1998). A sua ação passa pela analogia estrutural com a isoleucina, um aminoácido que faz parte da cadeia peptídica em crescimento, sendo que a mupirocina se liga, de forma competitiva, ao enzima isoleucina-tARN sintetase bloqueando a síntese proteica (Fluit et al., 2001).

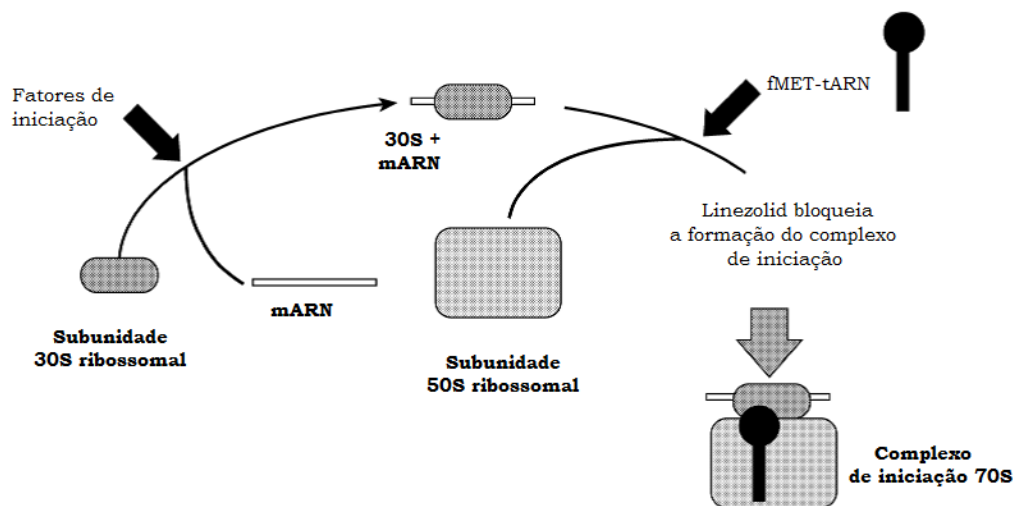
#### 1.2.2.8 Fenicóis

O cloranfenicol, produzido inicialmente a partir de culturas de *Streptomyces venezuelae* em 1947, é agora um antibiótico sintético (Willey et al., 2008). O florfenicol é um derivado sintético do cloranfenicol, de uso exclusivo em Medicina Veterinária, que foi introduzido em Medicina Veterinária nos países da União Europeia em 1995, para tratamento de infecções respiratórias em grandes animais (Kehrenberg & Schwarz, 2006). O espectro de ação destes antibióticos é semelhante e inclui bactérias Gram-positivo e Gram-negativo aeróbios e anaeróbios (Schwarz, Kehrenberg, Doublet & Cloeckert, 2004). A sua atividade bacteriostática passa por serem potentes inibidores da síntese proteica, onde a sua ligação à subunidade 50S do ribossoma previne o alongamento da cadeia peptídica em formação (Schwarz et al., 2004).

#### 1.2.2.9 Oxazolidinonas

Este grupo de antibióticos foi descoberto no princípio dos anos 80, mas só nos anos 90 foi descoberta a linezolida, o antibiótico deste grupo com maior utilização em Medicina Humana (Sousa, 2006), onde foi introduzido no início de 2001 (Ertek, Yazgi, Aktas, Ayyildiz & Parlak, 2003). A sua ação bacteriostática manifesta-se contra estafilococos meticilina-resistente. (Lentino, Narita & Yu, 2008). Num estudo conduzido por Ertek et al. (2003), foram realizados testes de susceptibilidade a antibióticos pelo método de difusão de disco a 164 *Staphylococcus* spp. de origem humana, e nenhum mostrou resistência à linezolida, teicoplanina e à vancomicina, mostrando que este antibiótico é uma alternativa viável no tratamento de infeções por MRSA. As oxazolidinonas ligam-se à subunidade 50S do ribossoma, prevenindo a ligação à subunidade 30S, impedindo a formação do complexo 70S (Livermore, 2003), como mostra a figura 3. Possuem, então, um mecanismo de ação único, ao inibir a ligação do iniciador fMet-tARN, impedindo a síntese proteica logo no seu início (Shinabarger & Eliopoulos, 2009); já os outros inibidores da síntese proteica, como os macrólidos, lincosamidas e tetraciclina permitem que a tradução do mRNA se inicie mas inibem o alongamento do péptido (Livermore, 2003).

Figura 3 – Mecanismo de ação das oxazolidinonas (adaptado de Livermore, 2003).



#### 1.2.2.10 Nitrofurantoína

As infecções do trato urinário (ITU) são dos problemas mais frequentes em clínica de animais de companhia, sendo que o *S. pseudintermedius* é encontrado em 12 a 20% dos casos (Maaland & Guardabassi, 2011). A nitrofurantoína é um antibiótico sintético pertencente ao grupo dos nitrofuranos, que tem vindo a ser usado ao longo dos últimos 50 anos, principalmente no tratamento deste tipo de infecções (Garau, 2008). Apesar de não estar licenciada para o uso em Medicina Veterinária, o clínico pode recorrer à sua utilização, ao abrigo da “cascata”, uma condição especial de utilização de medicamentos que pode ser acionada caso não exista nenhum medicamento permitido para o tratamento de uma doença e para evitar um sofrimento inaceitável ao animal. Contudo, devido à elevada toxicidade, não é um antibiótico de primeira escolha no tratamento das ITU (Maaland & Guardabassi, 2011). O seu modo de ação ainda não é bem conhecido, com estudos em *E. coli* a demonstrarem que as estirpes bacterianas são suscetíveis ou resistentes a estes fármacos conforme a sua capacidade de reduzir estes compostos (Sandegren, Lindqvist, Kahlmeter & Andersson, 2008). Assim, parece que os nitrofuranos precisam de ser reduzidos para mostrar o seu efeito antimicrobiano, e os metabolitos resultados dessa redução parecem ser capazes de se ligar ao ribossoma (Hooper, 2005).

#### **1.2.3 Inibidores da síntese de ácidos nucleicos**

Estes fármacos atuam por bloqueio da replicação ou da transcrição, ao inibirem o enzima ADN polimerase ou os enzimas ADN helicase ou ARN polimerase, respetivamente (Willey et al., 2008).

### 1.2.3.1 Quinolonas

São antibióticos sintéticos, descobertos em 1958, sendo o ácido nalidíxico a primeira quinolona a ser utilizada na prática clínica para o tratamento de infecções por bactérias Gram-negativo (Sousa, 2006). Desde aí, mais gerações de quinolonas foram sendo produzidas e utilizadas com diversos fins, como foi o caso da utilização da ciprofloxacina em 2001 nos Estados Unidos da América para tratamento do antrax (Willey et al., 2008). A evolução de que têm sido alvo ao longo dos anos, levaram-nas a ser agrupadas em gerações, à semelhança das cefalosporinas. Existem, então, quatro gerações (Sousa, 2006):

- 1ª geração: com atividade moderada contra bactérias Gram-negativo, mas praticamente sem atividade contra Gram-positivo e anaeróbios (ex: ácido nalidíxico);
- 2ª geração: com atividade satisfatória contra bactérias Gram-negativo, mas com ação limitada contra Gram-positivo (ex: ofloxacina, ciprofloxacina, enrofloxacina e norfloxacina);
- 3ª geração: boa atividade contra bactérias Gram-negativo e positivo (ex: levofloxacina e pradofloxacina);
- 4ª geração: boa atividade contra bactérias Gram-negativo e anaeróbios estritos e com muito boa atividade contra Gram-positivo (ex: moxifloxacina e trovafloxacina).

Estes antibióticos precisam de atingir um nível mínimo de acumulação intracelular para que passem a exercer o seu efeito bactericida (Zhanel et al., 1999). Já dentro da célula, apresentam mecanismos de ação diferentes consoante a natureza das bactérias: nas Gram-negativo há inibição da topoisomerase II, ou ADN girase, enquanto nas bactérias Gram-positivo a inibição faz-se na topoisomerase II ou IV, dependendo da quinolona em questão. Ao interferirem com as topoisomerases, as quinolonas vão interferir com o enrolamento do ADN, não permitindo a sua replicação e transcrição (Fluit et al., 2001). São altamente eficazes contra bactérias entéricas, como a *E. coli* e a *Klebsiella pneumoniae*, tendo também boa ação contra Gram-positivo, como *S. aureus* e *Mycobacterium tuberculosis* (Willey et al., 2008).

### 1.2.3.2 Rifamicinas

As rifamicinas foram obtidas pela primeira vez em 1959 a partir de culturas de *Amycolatopsis mediterranei*, possuindo um largo espectro de ação contra Gram-positivo, mas menos ativo contra Gram-negativo (Floss & Yu, 2005). A sua fraca atividade contra Gram-negativo é explicada pela impermeabilização da membrana celular destas bactérias ao fármaco (Sousa, 2006). O desenvolvimento de novas rifamicinas semi-sintéticas levaram à descoberta da rifampicina, que continua com boa atividade contra bactérias Gram-positivo, particularmente

potente contra estafilococos, e melhor atividade contra Gram-negativo (Moorman & Mandell, 1981). A sua principal aplicação é no tratamento da tuberculose em humanos, tendo atividade contra *Mycobacterium tuberculosis* e *M. leprae* (Sousa, 2006). O mecanismo comum a todas as rifamicinas parece ser a inibição da ARN polimerase ADN-dependente (Floss & Yu, 2005). Nas células bacterianas suscetíveis à sua ação, este antibiótico inibe a ARN polimerase, a enzima responsável pela transcrição do ADN, fazendo com que não ocorra síntese de mARN, ou seja, não existe transcrição, tendo efeito bactericida (Wehrli, 1983). A resistência a este antibiótico surge mais rapidamente em monoterapia, pelo que se aconselha a sua associação com outros antibióticos (Floss & Yu, 2005).

#### **1.2.4 Antagonistas metabólicos**

Estes antibióticos atuam como anti-metabolitos, por antagonismo ou bloqueio das vias metabólicas, ao inibirem, de forma competitiva, o uso de certos metabolitos por enzimas. Possuem efeito bacteriostático, pois impedem o desenvolvimento bacteriano por carência do ácido fólico mas, apesar de serem análogos deste metabolito, apresentam diferenças suficientes para que se mantenha o normal funcionamento celular (Willey et al., 2008). Os mamíferos não sintetizam ácido fólico, necessitando da dieta como fonte deste metabolito; já as bactérias possuem uma membrana celular impermeável à entrada de ácido fólico exógeno, pois possuem informação genética que lhes permite produzi-lo endogenamente. Assim, fica explicada a toxicidade seletiva destes antibióticos (Sousa, 2006).

##### 1.2.4.1 Sulfonamidas

Estes fármacos foram os primeiros anti-metabolitos a serem usado com sucesso na prática clínica (Willey et al., 2008). Eles competem com um fator indispensável para a síntese do ácido fólico, o ácido p-aminobenzóico (PABA) pela ligação ao enzima dihidropteroato sintetase (DHPS), catalisadora da reação que origina o ácido dihidropteróico que é essencial à síntese do ácido fólico (Brown, 1962).

##### 1.2.4.2 Trimetoprim

Está disponível no mercado de vários países da Europa e nos Estados Unidos da América desde 1975 (Lacey, 1982). O trimetoprim atua uns passos mais à frente na cadeia metabólica em relação às sulfonamidas, por inibição competitiva com o enzima dihidrofolato redutase (DHFR). Não havendo a reação catalisada por este enzima, não ocorre a redução do ácido dihidrofólico em ácido tetrahidrofólico (Roth, Falco, Hitchings & Bushby, 1962).

#### 1.2.4.3 Associação Trimetoprim/Sulfametoxazol

Esta associação tem vindo a ser utilizada desde a sua introdução no mercado no ano de 1968, pois impede dois passos sucessivos na mesma cadeia metabólica: o sulfametoxazol inibe o enzima DHPS, enquanto o trimetoprim inibe o enzima DHFR (Sousa, 2006). Na tabela 2 encontramos as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) correspondentes à utilização destes dois fármacos isolados e em conjunto, em algumas estirpes clínicas.

Tabela 2 – Efeito na CIMs da associação trimetoprim-sulfametoxazol, em proporção de 1 para 20, em alguns isolados clínicos (Bushby S. M., 1975).

CIM (µg/ml)				
Organismo	Sulfametoxazol		Trimetoprim	
	Isolado	Em associação	Isolado	Em associação
<i>S. pyogenes</i>	>100	1	1	0.05
<i>S. pneumoniae</i>	30	2	2	0.1
<i>S. aureus</i>	3	0.3	1	0.015
<i>H. influenzae</i>	10	0.3	1	0.015

São ambos bacteriostáticos e, em associação, alargam o seu espectro de ação, sendo eficazes contra bactérias Gram-positivo e negativo e contra alguns fungos e protozoários (Sousa, 2006). Esta associação torna-se vantajosa principalmente na redução do desenvolvimento de resistências bacterianas em relação ao uso destes dois fármacos de forma isolada (Bushby & Hitchings, 1968).

### **1.3 Mecanismos de resistência bacteriana**

Os microrganismos resistentes têm vindo a tornar-se prevalentes no ambiente, devido à pressão de seleção provocada pelos antibióticos, onde só os indivíduos que adquirem formas de resistir à sua ação sobrevivem (Ogawara, 1981). Considera-se que um organismo é resistente a um antibiótico quando as concentrações presentes desse fármaco não são suficientes para ou inibir o desenvolvimento bacteriano ou provocar a sua lise (Witte & Klare, 1999). Foram identificados apenas um número limitado de mecanismos que dão origem a resistência bacteriana: a) restrição do acesso do antibiótico ao local alvo, por diminuição da permeabilidade celular a este; b) efluxo ativo do antibiótico para fora da célula bacteriana; c)



mutações no local de ligação do fármaco; d) vias metabólicas alternativas aquelas inibidas pelo antibiótico; e e) modificação ou degradação do antibiótico por enzimas (McDermott et al., 2003).

Nem todos os mecanismos de resistência existem em todas as bactérias, pois alguns parecem ser específicos de certas espécies (Schwarz & Chaslus-Dancla, 2001). A resistência bacteriana pode ser intrínseca, constituindo parte do genoma da bactéria, sendo específica da espécie bacteriana, ou adquirida, estando frequentemente associada à aquisição de elementos genéticos móveis que transportam um ou mais genes de resistência (Aleksium & Levy, 2000). Este último tipo de resistência é o mais importante no que toca ao problema das resistências antimicrobianas, tanto em Medicina Humana como Veterinária (Schwarz & Chaslus-Dancla, 2001). Em *S. pseudintermedius* já foram identificados alguns genes de resistência bacteriana, sendo que a maioria foi igualmente identificada noutras espécies de estafilococos (Kadlec & Schwarz, 2012). A tabela 3 sintetiza os genes de resistência já identificados no GSI e qual o mecanismo de resistência que codificam.

Tabela 3 – Genes de resistência a antimicrobianos e resistência que codificam em estirpes do GSI (adaptado de Kadlec & Schwarz, 2012).

Grupo de antibiótico	Gene de resistência	Mecanismo de resistência
<b>β-lactâmicos</b>	<i>mecA</i> <i>blaZ</i>	Alvo alternativo Hidrólise do β-lactâmico
<b>Aminoglicosídeos</b>	<i>aacA-aphD</i>	Inativação da gentamicina, tobramicina e canamicina por acetilação/fosforilação
<b>Tetraciclinas</b>	<i>tet(M)</i> <i>tet(O)</i> <i>tet(K)</i> <i>tet(L)</i>	Proteção ribossomal Proteção ribossomal Sistema de efluxo Sistema de efluxo
<b>Macrólidos e Lincosamidas</b>	<i>erm(A)</i> <i>erm(B)</i> <i>erm(C)</i> <i>msr(A)</i> <i>lnu(A)</i>	Metilação da subunidade 23S rARN  Sistema de efluxo Inativação do fármaco
<b>Ácido fusídico</b>	<i>fusC</i>	Proteção do alvo
<b>Cloranfenicol</b>	<i>cat<sub>PC221</sub></i>	Inativação do fármaco
<b>Rifampicina</b>	<i>Não aplicável</i>	Mutação no gene <i>rpoB</i>
<b>Quinolonas</b>	<i>Não aplicável</i>	Mutação nos genes <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> , <i>griA</i> e <i>griB</i>

Trimetoprim	<i>dfrG</i>	Alvo alternativo insensível
-------------	-------------	-----------------------------

### 1.3.1 Resistência aos $\beta$ -lactâmicos

Pelo facto dos  $\beta$ -lactâmicos serem um grupo de antibióticos largamente usado, não é surpreendente que a resistência a estes antibióticos seja comum e que continue a evoluir (Fluit et al., 2001). Para que um  $\beta$ -lactâmico seja eficaz, tem de ocorrer ligação aos alvos na membrana celular, estabilidade às  $\beta$ -lactamases e, no caso das bactérias Gram-negativo, permeabilidade da membrana externa. Assim, a resistência surge por alteração de um destes três fatores (Georgopapadakou, 1993). A produção de  $\beta$ -lactamases é o mecanismo de resistência mais encontrado em bactérias Gram-negativo (Philippon et al., 2002); já nas bactérias Gram-positivo o mecanismo mais frequente é o que envolve alteração nas PLPs (Georgopapadakou, 1993). A alteração das PLPs origina uma diminuição na sua quantidade ou na afinidade destas proteínas para se ligarem aos  $\beta$ -lactâmicos (Malouin & Bryan, 1986). Na tabela 4 é possível consultar as PLPs existentes em algumas bactérias com importância clínica e a que  $\beta$ -lactâmico conferem resistência.

Tabela 4 – PLPs associadas a resistências em bactérias com importância clínica (adaptado de Georgopapadakou, 1993).

Bactéria	Resistência a	PLP
<i>S. aureus</i>	Meticilina, maioria dos $\beta$ -lactâmicos	2a
	Cefalexina	3
<i>S. epidermidis</i>	Meticilina, maioria dos $\beta$ -lactâmicos	2 <sup>a</sup>
<i>S. pneumoniae</i>	Ampicilina	1a, 2a, 2b e 2x
<i>E. faecalis</i>	Maioria dos $\beta$ -lactâmicos	1 e 3
<i>E. faecium</i>	Maioria dos $\beta$ -lactâmicos	1 e 2
<i>E. coli</i>	Meticilina	2
	Cefalexina	3
<i>P. aeruginosa</i>	Piperacilina	3
	Cefsulodin	3
<i>H. influenzae</i>	Ampicilina	4
	$\beta$ -lactâmicos	3, 4 e 5
<i>A. calcoaceticus</i>	$\beta$ -lactâmicos	1 e 3
<i>N. gonorrhoeae</i>	$\beta$ -lactâmicos	1 e 2
<i>N. meningitidis</i>	$\beta$ -lactâmicos	2
<i>B. fragilis</i>	Cefoxitina	1 e 2

## **$\beta$ -lactamases**

São enzimas descritas pela primeira vez em 1940 em *E. coli*, podendo ser plasmídicas ou cromossômicas, e inativam os  $\beta$ -lactâmicos por hidrólise do seu anel. Em bactérias Gram positivo, as  $\beta$ -lactamases produzidas são excretadas para o meio ambiente (Georgopapadakou, 1993). São por vezes chamadas de penicilinases, cefalosporinas e carbapenemases consoante a sua especificidade para certos  $\beta$ -lactâmicos (Sousa, 2006). Nos estafilococos está descrita apenas uma penicilinase, com ação sobre as aminopenicilinas (penicilina e ampicilina) codificada pelo gene *blaZ*, sendo este o principal mecanismo de resistência nestas bactérias (Olsen, Christensen & Aarestrup, 2006). Em 2005, a resistência de *S. aureus*, provenientes de animais e humanos, à penicilina situava-se nos 90% (Weese, 2005). Num estudo realizado com estirpes de cão e gato provenientes da Europa e da América do Norte, 102 dos 103 (99%) isolados de MRSP de cão e todos os 12 (100%) isolados de MRSP de gato apresentavam o gene *blaZ* (Kadlec et al., 2010; Perreten et al., 2010).

## **Estafilococos resistentes à meticilina (MRS)**

No caso particular dos estafilococos, as resistências de baixo nível estão associadas à sobreprodução de  $\beta$ -lactamases, aumento dos níveis de PLPs ou redução da sua afinidade para os  $\beta$ -lactâmicos (Barg, Chambers & Kernodle, 1991); já os altos níveis de resistências envolvem a presença do gene *mecA* ou gene *mecC*, que codifica a produção de uma PLP alterada, a PLP2a ou PLP2', com pouca afinidade para os  $\beta$ -lactâmicos (Berger-Bachi, 1994). Esta alteração nas PLPs parece ser o provável mecanismo envolvido no aparecimento das estirpes MRSA (Malouin & Bryan, 1986). O gene *mecA*, que se situa num elemento genético móvel, a cassete cromossomal *mec* de estafilococos (*SCCmec*) (Kadlec & Schwarz, 2012) pode ser expresso de forma constitutiva ou induzida por alguns  $\beta$ -lactâmicos (Berger-Bachi, 1994). Até 2007, ainda não tinham sido detetadas na Europa estirpes MRSP (Loeffler et al., 2007). Para que as estirpes sejam classificadas como MRS, para além da exibição do fenótipo de resistência à oxacilina, é necessário a confirmação da presença do gene *mecA* (Kadlec & Schwarz, 2012).

### **1.3.2 Resistência aos Glicopéptidos**

A vancomicina e a teicoplanina são antibióticos considerados de último recurso para o combate de infeções por estafilococos multirresistentes em Medicina Humana, não sendo, por isso, aprovados para uso em Medicina Veterinária. Contudo, outros glicopéptidos, como a avoparcina, são usados como promotores de crescimento em animais de produção, sendo assim uma possível fonte de organismos resistentes aos glicopéptidos (Kirst, Thompson &

Nicas, 1998). No final dos anos 80 apareceram as primeiras estirpes resistentes à vancomicina, sendo que estafilococos e enterococos que são resistentes à vancomicina geralmente também o são à teicoplanina (Sousa, 2006). No entanto, o contrário não se verifica, visto que têm sido descritas algumas estirpes de *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* teicoplanina-resistente, mas suscetíveis à vancomicina (Sousa, 2006). O fenótipo VanA é o mais encontrado nas estirpes com resistência de alto nível tanto à vancomicina como à teicoplanina. A posse do gene *vanA* faz com que as bactérias consigam produzir uma ligase D-ala-D-ala diferente, resultando numa alteração da cadeia lateral do peptidoglicano, possuindo menos afinidade para este grupo de antibióticos (Fluit et al., 2001). Menos frequente, mas igualmente descritos estão os fenótipos VanC, VanE (Fines, Perichon, Reynolds, Sahm & Courvalain, 1999) e VanD (Perichon, Reynolds & Courvalain, 1997). A resistência à teicoplanina parece desenvolver-se mais rapidamente que à vancomicina (Sousa, 2006), sendo que logo em 1987 se verificaram os primeiros ECN resistentes à vancomicina (Liñares, 2001). Em Medicina Veterinária, tem sido pouco descrita a resistência a estes antibióticos. Num estudo de Haenni et al (2010), foram estudados 60 estafilococos com origem em necrópsias de cavalos (59 *S. aureus* e 1 *S. pseudintermedius*), sendo que nenhum apresentava resistência tanto à vancomicina como à teicoplanina.

#### ***Staphylococcus aureus* resistentes à vancomicina (VRSA)/intermédio aos glicopéptidos (GISA)**

Em 2002 no Michigan, Estados Unidos da América, foi referida a primeira estirpe de *S. aureus* resistente à vancomicina (VRSA), possuindo o gene *vanA*, que medeia a resistência à vancomicina e teicoplanina em enterococos (Sousa, 2006), sendo a origem desta estirpe explicada pela transferência conjugativa desse gene entre enterococos e estafilococos (Weese, 2005). Já anteriormente, em 1997 no Japão, tinha sido relatada resistência intermédia à vancomicina numa estirpe de *S. aureus* (VISA) (Sousa, 2006). Em Portugal, foi este ano reportado o primeiro caso de infeção por VRSA em Humanos, sendo este o primeiro caso de infeção causado por esta estirpe na Europa (Melo-Cristino, Resina, Manuel, Lito & Ramirez, 2013). Ainda não foram reportadas estirpes VRSA em animais, possivelmente pela menor incidência de estirpes de enterococos resistentes a este antibiótico e pela sua menor utilização em animais (Weese, 2005). Como se tem verificado que algumas das estirpes VISA são também intermédias à teicoplanina, o conceito de *S. aureus* intermédio a glicopéptidos (GISA) parece mais adequado. Aparentemente, a frequência dos GISA é muito baixa, sendo que em 2001 apenas tinham sido descritos 10 casos em todo o mundo (Liñares, 2001). O mecanismo que lhes confere resistência passa pela produção excessiva de precursores da

parede celular, conferindo uma parede mais espessa às estirpes GISA, provocando o aprisionamento da vancomicina e teicoplanina e impedindo que estes cheguem ao seu local de atuação (Livermore, 2000).

### 1.3.3 Resistência aos Aminoglicosídeos

Apesar da ação dos aminoglicosídeos se fazer por ligação ao ribossoma, a modificação deste não é o mecanismo de resistência bacteriana mais predominante (Kotra et al., 2000). A resistência bacteriana a estes antibióticos pode surgir por: a) alteração no local de ligação ribossomal; b) diminuição da captação do antibiótico por parte da bactéria, mecanismo este que aparece principalmente em *Pseudomonas* spp., provavelmente devido a uma impermeabilização da membrana, afetando todos os aminoglicosídeos e conferindo-lhes uma resistência moderada; c) modificação enzimática do antibiótico, inativando-o (Davies & Wright, 1997), sendo este o mecanismo de resistência mais comum (Kotra et al., 2000). A modificação enzimática dos aminoglicosídeos resulta numa modificação química do fármaco, que fica com pouca afinidade para ligação ao ribossoma (Mingeot-Leclercq et al., 1999). Dependente do tipo de modificações que causam, estes enzimas denominam-se acetiltransferases (ACC), adeniltransferases (ANT) ou fosfotransferases (APH) (Fluit et al., 2001). Em animais, já foi identificado o gene *aacA-aphD* em *S. pseudintermedius* de origem canina, gene esse que confere resistência à canamicina, gentamicina e tobramicina (Kadlec & Schwarz, 2012).

### 1.3.4 Resistência às Tetraciclínas

De forma generalizada, as bactérias que manifestam resistência a uma tetraciclina também o manifestam às outras (Sousa, 2006). A aquisição de resistência à atividade bacteriostática das tetraciclínas tem vindo a aumentar entre diferentes espécies de bactérias (Fluit et al., 2001), sendo observada uma elevada prevalência de resistências a estes fármacos (Sousa, 2006).

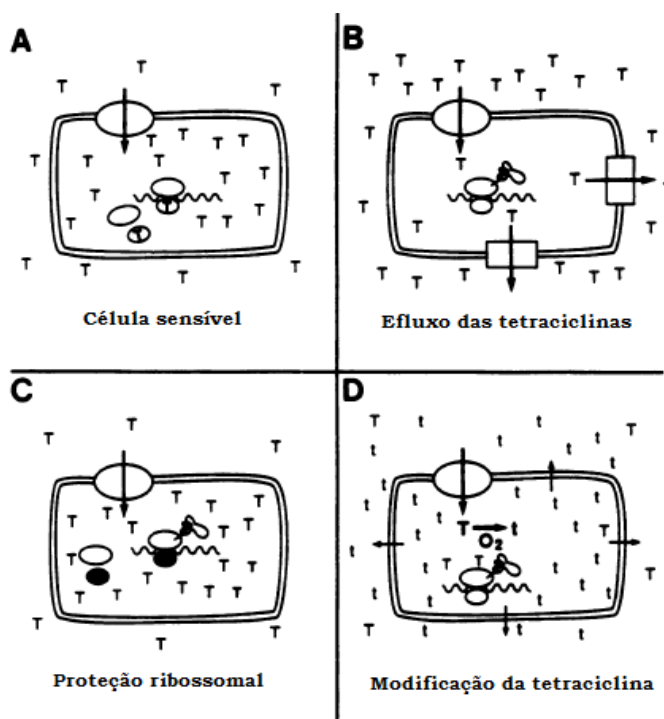
Os mecanismos de resistência a estes fármacos, ilustrados na figura 4, podem ser por:

a) efluxo do fármaco, reduzindo a concentração intracelular do fármaco, conferindo resistência à tetraciclina mas não à minociclina. (Chopra, Hawkey & Hinton, 1992). Os genes *tet(K)* e *tet(L)*, que conferem este tipo de resistência, são geralmente encontrados em plasmídeos de pequenas dimensões em estafilococos (Gillespie et al., 1987).

b) Proteção ribossomal, mediada por proteínas citoplasmáticas, conferindo resistência à tetraciclina, doxiciclina e minociclina. Os genes *tet(M)* e *tet(O)* são os mais estudados e caracterizados em *Staphylococcus* spp. (Chopra & Roberts, 2001).

c) Inativação enzimática da tetraciclina, sendo que apenas 3 genes foram até agora identificados conferindo este tipo de resistência, o *tet(X)*, *tet(34)* e *tet(36)* (Roberts, 2005).

Figura 4 – Diferentes mecanismos de resistência às tetraciclinas (adaptado de Speer, Shoemaker & Salyers, 1992).



A maioria dos genes de resistência codifica um dos dois mecanismos de resistência mais importantes nas tetraciclinas: efluxo do antibiótico ou proteção ribossomal (Fluit et al., 2001). Na tabela 5 é possível encontrar os diferentes determinantes genéticos identificados e qual o mecanismo de ação que codificam. Os genes *tet* estão sobre um controle de um gene

repressor, visto que só na presença de um indutor, nomeadamente as tetraciclinas, é que há síntese de mRNA que codifica a síntese de proteínas Tet (Sousa, 2006), sendo que o estado induzido se perde 8 a 10 horas de crescimento na ausência do indutor (Inoue et al., 1970). Na maioria das bactérias, a resistência às tetraciclinas surge devido à aquisição de novos genes, na sua maioria associados a elementos móveis (Chopra & Roberts, 2001). Numa revisão efetuada por Roberts (2005), verificou-se que existiam 38 genes *tet* e *otr* descritos, incluindo 23 genes que codificam proteínas que causam o efluxo das tetraciclinas, 11 genes que codificam proteínas protetoras do ribossoma e 3 genes que codificam inativação enzimática do fármaco.

Tabela 5 – Mecanismos de resistência mediado pelos genes *tet* e *otr* (adaptado de Roberts, 2005).

Mecanismos de resistência			
Efluxo do antibiótico (n=23)	Proteção ribossomal (n=11)	Enzimas inativadoras (n=3)	Desconhecido (n=1)
<i>tet(A)</i> , <i>tet(B)</i> , <i>tet(C)</i> , <i>tet(D)</i> , <i>tet(E)</i> , <i>tet(G)</i> , <i>tet(H)</i> , <i>tet(J)</i> , <i>tet(V)</i> , <i>tet(Y)</i> , <i>tet(Z)</i> , <i>tet(30)</i> , <i>tet(31)</i> , <i>tet(K)</i> , <i>tet(L)</i> , <i>tetA(P)</i> , <i>otr(B)</i> , <i>tet(33)</i> , <i>tet(35)</i> , <i>tet(38)</i> , <i>tet(39)</i> , <i>otr(C)</i>	<i>tet(M)</i> , <i>tet(O)</i> , <i>tet(S)</i> , <i>tet(W)</i> , <i>tet(Q)</i> , <i>tet(T)</i> , <i>otr(A)</i> , <i>tetB(P)</i> , <i>tet(32)</i> , <i>tet(36)</i>	<i>tet(X)</i> , <i>tet(34)</i> , <i>tet(36)</i>	<i>tet(U)</i>

Em estafilococos do GSI já foram documentados os genes *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)* e *tet(O)* (Kadlec & Schwarz, 2012). Em estudos recentes realizados em 103 MRSP de origem canina e 12 de origem felina foi detetada a presença do gene *tet(K)* em 50.5% das estirpes, o *tet(M)* em 17,5% e ambos os genes em 1,9% das estirpes (Kadlec et al., 2010; Perreten et al., 2010).

### 1.3.5 Resistência aos antibióticos MLS (Macrólidos, Lincosamidas e Estreptograminas)

Todos os membros desta família partilham um modo de ação semelhante, por inibição da síntese proteica, sendo suscetíveis a mecanismos de resistência semelhantes (Lamb et al., 1999; Leclercq et al., 1992). Parecem existir três mecanismos diferentes de resistência adquirida aos MLS nas bactérias Gram-positivo (Weisblum, 1999). Como mecanismo de resistência mais comum temos a modificação, por metilases codificadas por genes *erm*, da porção 23S rRNA, local de ligação dos antibióticos MLS<sub>B</sub> (macrólidos, lincosamidas e estreptograminas B), conferindo às bactérias resistência cruzada a estes antibióticos (Robert et al., 1999) provavelmente devido à sobreposição dos locais de ligação destes fármacos (Leclercq & Courvalin, 1991). A resistência causada pelos gene *erm* não afeta os antibióticos compostos por estreptograminas do tipo A, fazendo com que associações de estreptograminas dos dois tipos mantenham a sua eficácia contras estirpes resistentes aos MLS<sub>B</sub> (Fluit et al., 2001).

Devido à integração do gene *erm* num operão indutível, em algumas estirpes bacterianas as metilases só são sintetizadas na presença de um indutor, que pode ser, por exemplo, a presença do fármaco (Sousa, 2006). Nos estafilococos, a expressão da resistência pode ser constitutiva, sendo a estirpe resistente a todos os antibióticos MLS<sub>B</sub>, ou induzida, ocorrendo resistência aos macrólidos dos grupos 14 (eritromicina e claritromicina) e 15 (azitromicina), mas não aos macrólidos do grupo 16 (espiramicina e tilosina), às lincosamidas e às estreptograminas (Fluit et al., 2001). O caráter indutível ou constitutivo da resistência está dependente da região reguladora a montante do gene estrutural da metilase e não da classe de determinantes *erm* presente na estirpe (Leclercq & Courvalin, 1991). Existem vários genes de resistência que codificam bombas que provocam o efluxo do fármaco, existindo três classes destes genes que foram descritas em cocos Gram-positivo: *mef*, *msr* e *vga* (Clancy, Dib-Hajj, Petitpas & Yuan, 1997). Os genes *mef*, que provocam o efluxo dos macrólidos, podem ser encontrados em organismos Gram-positivo, e por estarem associados a elementos conjugativos localizados no cromossoma, podem ser facilmente transferidos para outras espécies por conjugação (Luna et al., 1999). Os genes *msr* conferem resistência a macrólidos e a estreptograminas B. Em estafilococos, além dos genes *msr*, foram ainda identificados os genes *vga(A)* e *vga(B)*, que conferem resistência às estreptograminas A (Robert et al., 1999). Está igualmente descrito a resistência a este grupo de antibióticos devido a genes que codificam enzimas que hidrolisam as estreptograminas B, os genes *vgbA* e *vgbB*, ou que, por adição de um grupo acetil, modificam as estreptograminas A, os genes *vatA*, *vatB*, *vatC*, *satA* e *satG* (Fluit et al., 2001).



### Macrólidos

Poucos anos após a introdução da eritromicina no mercado, surgiram resistências a este fármaco em estafilococos que posteriormente se espalharam pelo Reino Unido, França e Estados Unidos da América (Leclercq & Courvalin, 1991). A resistência à eritromicina foi, até ao princípio dos anos 70, causada apenas pelo gene *ermA*, surgindo posteriormente, entre 1984 e 1988, uma dominância do gene *ermC* como principal causador da resistência a este antibiótico (Fluit et al., 2001). Em relação a este grupo de antibióticos é interessante referir que apesar da existência de vários genes de resistência, estudos conduzidos na Dinamarca por Westh, Hougaard, Vuus e Rosdahl em 1995 concluíram que os genes *ermA* e *ermC* foram responsáveis por 98% das resistências à eritromicina, em isolados de *S. aureus*. Estes dados são igualmente suportados por um estudo de 2000 de Schmitz et al., efetuado com isolados de *S. aureus* resistentes à eritromicina recolhidas em 24 hospitais da Europa, e que acrescenta que o gene *ermA* foi o mais encontrado em 88% das estirpes MRSA enquanto o gene *ermC* era mais comum nas estirpes de *Staphylococcus aureus* sensíveis à meticilina (MSSA), sendo este último gene também o mais comum em ECN. Já em estafilococos do grupo de *Staphylococcus intermedius*, parece haver dominância do gene *ermB* na resistência a estes fármacos (Kadlec & Schwarz, 2012). Tal facto foi, igualmente, suportado por um estudo de Couto, Belas, Couto, Perreten e Pomba (2013) em que as resistências encontradas em *S. pseudintermedius* aos macrólidos, lincosamidas e estreptograminas B por metilação da subunidade 23S ribossomal foram associadas ao gene *ermB*.

### Lincosamidas

A incidência de isolados de estafilococos resistentes às lincosamidas mas sensíveis aos macrólidos e às estreptograminas é baixa, como foi comprovado por um estudo de Lina et al. (1999), em que apenas um dos cento e quarenta e quatro *S. aureus* de origem humana e sete dos cento e cinquenta ECN também de origem humana testados possuíam o gene *lnu(A)*. Este gene codifica o enzima nucleotidiltransferase, que confere resistência às lincosamidas por alteração do fármaco (Lim et al., 2002). No estudo de Perreten et al. (2011), apenas 6 MRSP dos 103 estudados, com origem em animais, possuíam o gene *lnu(A)*. Recentemente, foi descoberto numa estirpe de *S. sciuri* o gene *cfr*, que confere resistência ao cloranfenicol, florfenicol e à clindamicina, não só em estafilococos, mas também em *E. coli*. Este gene causa a metilação da porção 23S do ribossoma, local de ação comum a estes três antibióticos, provocando uma alteração no seu local de ligação, o que faz com que haja menor afinidade para estes antibióticos (Kehrenberg, Schwarz, Jacobsen, Hansen & Vester, 2005).

### Estreptograminas

Apesar da resistência à família MLS<sub>B</sub> ser frequente, a resistência à quinupristina/dalfopristina não o é (Lamb et al., 1999). Existem mecanismos de resistência diferentes para a quinopristina e para a dalfopristina. A resistência à primeira é geralmente mediado pelo gene *erm*, conferindo assim resistência também aos macrólidos e lincosamidas. Já foram igualmente descritas lactonases que inativam esta estreptogramina, codificadas pelo gene *vgbA*, em *S. aureus* (Sousa, 2006). Quanto à resistência à dalfopristina, pode ser mediada pelos genes *vata*, *vatB* e *vatC*, que inativam a molécula, ou pelos genes *vgaA* e *vgaB*, que codificam a síntese de bombas de efluxo para este antibiótico (Sousa, 2006).

#### **1.3.6 Resistência ao Ácido fusídico**

Dos mecanismos de resistência a este fármaco, o mais bem descrito é a alteração no factor G de alongamento (Turnidge & Collignon, 1999). Outro mecanismo de resistência também já verificado é a diminuição da permeabilidade da membrana ou parede celular ao fármaco, mediada por plasmídeos (Turnidge & Collignon, 1999). Em *S. aureus*, a resistência a este fármaco surge ou pela codificação de uma proteína Factor G de alongamento que protege a bactéria da ação do ácido fusídico, por aquisição horizontal do determinante *fusB*, (O'Neil & Chopra, 2006) ou pelo resultado de uma mutação espontânea no gene *fusA*, que codifica a proteína factor G de alongamento (O'Neil, Larsen, Henriksen & Chopra, 2004), ocorrendo em todas as populações bacterianas, mesmo naquelas que nunca foram expostas ao ácido fusídico (Dobie & Gray, 2004). Apesar de comprovada a existência de resistências em isolados clínicos de *S. aureus* e de a sua frequência ter vindo a aumentar, esta resistência continua a ser em níveis reduzidos (Brow & Thomas, 2002). Em *S. pseudintermedius*, já foram descritas duas estirpes resistentes a este antibiótico possuindo o gene *fusC* (O'Neill, McLaws, Kahlmeter, Henriksen & Chopra, 2007). Estudos em humanos têm sido realizados com o intuito de verificar o nível de resistência existentes ao nível da pele, visto o ácido fusídico ser usado, principalmente, como agente tópico. Num estudo realizado por Shah e Mohanraj (2003) dos isolados de *S. aureus* obtidos de pacientes de dermatologia, 50% eram resistentes ao ácido fusídico, sendo que 96% dos pacientes tinham usado formulações contendo este composto nos 6 meses prévios à recolha das amostras.

#### **1.3.7 Resistência à Mupirocina**

Devido ao mecanismo de ação único deste fármaco (inibição da isoleucina-tARN sintetase), não se verificam resistências cruzadas entre este antibiótico e antibióticos de outros grupos (Sutherland et al., 1985). Podemos detetar dois tipos de fenótipos de resistência: o de baixo

nível, que se deve, provavelmente, a uma mutação no enzima isoleucina-tARN sintetase da bactéria (Cookson, 1998); e a de alto nível, resultante da presença de uma isoleucina-tARN que é menos sensível à ação da mupirocina, codificada pelo gene *mupA*, localizado em plasmídeos (Fluit et al., 2001). Em *S. pseudintermedius* a resistência a este fármaco parece ser muito rara (Kadlec & Schwarz, 2012). As primeiras resistências em *S. aureus* surgiram nos finais dos anos 80, sendo que as resistências de baixo nível seriam conferidas pela presença do gene *mupA* (Ramsey, Bradley, Kauffman & Morton, 1996). Contudo, um estudo realizado por Fujimura, Watanabe e Beighton (2001) não revelou evidência de que a presença deste gene aumentasse a capacidade de estirpes *S. aureus* se tornarem resistentes a este antibiótico.

### **1.3.8 Resistência aos Fenicóis**

O principal mecanismo de resistência bacteriana difere entre o cloranfenicol e florfenicol. No caso do cloranfenicol a maioria das resistências é mediada, tanto em Gram-positivo como em negativo, pela ação da enzima cloranfenicol acetiltransferase, que provoca a inativação deste fármaco (Schwarz & Chaslus-Dancla, 2001). Contudo, não é capaz de inativar o florfenicol (Schwarz, Werckenthin & Kehrenberg, 2000). O gene que confere este tipo de resistência, o gene *cat*, é mais frequentemente encontrado em plasmídeos (Fluit et al., 2001). Dos três genes *cat* já identificados, o que se localiza no plasmídeo pC221 parece ser o mais frequente (Kadlec & Schwarz, 2012). Também tem sido descrito um mecanismo de resistência por sistemas de efluxo, que confere resistência apenas ao cloranfenicol ou uma resistência combinada ao cloranfenicol e florfenicol (Keys et al., 2000). O gene *fexA* já foi identificado tanto em estafilococos como em *E. coli*, e codifica uma proteína de efluxo, com localização plasmídica, que confere resistência ao florfenicol e ao cloranfenicol (Kehrenberg & Schwarz, 2006). Como já foi referido, o gene *cfr* foi identificado recentemente, e confere resistência tanto ao cloranfenicol como ao florfenicol, mas também à clindamicina, em estafilococos e em *E. coli* (Schwarz et al., 2000). Este gene codifica uma enzima que provoca a metilação da porção 23S do ribossoma (Kehrenberg & Schwarz, 2006).

### **1.3.9 Resistência à Linezolida**

Ainda que a linezolida só tenha sido licenciada para uso em Medicina Humana no mercado Europeu em 2001, as resistências a este antibiótico já se faziam sentir nos Estados Unidos da América desde 1999, em enterococos, apesar de se manterem raras (Menichetti, 2005). Contudo, ainda não tinham sido detetadas resistências entre isolados clínicos de *S. aureus* até 2001 (Tsiodras et al., 2001). Desde a identificação da primeira estirpe resistente, têm sido identificadas estirpes de estafilococos e enterococos resistentes ao linezolida de origem

humana um pouco por todo o mundo, apesar de continuarem a ser esporádicas (Bongiorno et al., 2010). Num estudo de Perreten et al. (2010) não foram encontradas estirpes de MRSP resistentes ao linezolid entre as 103 estudadas. Devido ao seu mecanismo de ação único, o seu alvo não é comum aos dos outros antibióticos inibidores da síntese proteica. Assim, não é inativado pelas rARN metilases que modificam a porção 23S, mecanismo que inibe macrólidos, lincosamidas e estreptograminas B (Livermore, 2003). Visto que este antibiótico é sintético, é menos provável a ocorrência de resistências intrínsecas das bactérias (Moellering, 2003). O principal mecanismo de resistência até há pouco tempo consistia na substituição de nucleótidos no domínio V do gene que codifica a porção 23S do ribossoma (Bongiorno et al., 2010). Recentemente, um novo mecanismo de resistência não mutacional foi descoberto em isolados de estafilococos de origem animal, envolvendo a aquisição do gene *cfr* (Morales et al., 2010). Este gene medeia a produção de uma metiltransferase, enzima que causa a metilação da porção 23S do ribossoma, atribuindo resistência ao cloranfenicol, florfenicol e clindamicina (Kehrenberg et al., 2005), sendo que a primeira notificação de resistência ao linezolid mediada por este gene foi em 2007, num isolado de MRSA (Toh et al., 2007).

#### **1.3.10 Resistência à Nitrofurantoína**

O aparecimento de estirpes resistentes à nitrofurantoína mantém-se raro, apesar dos muitos anos que já leva de uso na prática clínica de Medicina Humana. A resistência em estirpes de *E. coli*, mediada por genes localizados em plasmídeos ou em cromossomas, parece estar associada à inibição do enzima nitrofurano redutase, havendo diminuição da produção dos metabolitos resultantes da redução do antibiótico (Garau, 2008). Num estudo de Maaland (2011), em que foram estudados 13 *S. pseudintermedius*, nenhum se revelou resistente à nitrofurantoína.

#### **1.3.11 Resistência às Quinolonas**

Como já foi dito, a atuação das quinolonas passa pela inibição das topoisomerasas II e IV. Estas proteínas são compostas por duas subunidades, a A e a B, codificadas pelos genes *gyrA* e *gyrB*, na topoisomerase II, e pelos genes *griA* e *griB* (*parC* e *parE* em bactérias Gram-negativo) na topoisomerase IV, de tal modo que parece existir uma homologia entre estes genes, ou seja, o gene *gyrA* é homólogo do gene *griA* e o gene *gyrB* é homólogo do gene *griB* (Fluit et al., 2001). Os mecanismos de resistência a estes antibióticos são, principalmente, a alteração do alvo do antibiótico e a diminuição da interação entre o fármaco e o seu alvo (Hooper, 1999). Mais frequentemente, ocorre uma mutação, com maior frequência num dos

genes *gyrA/grlA*, que induz uma modificação na conformação do local de ligação da quinolona à topoisomerase II/topoisomerase IV, perturbando a sua interação (Fluit et al., 2001). Por outro lado, a resistência de baixo nível tanto em bactérias Gram-positivo como em Gram-negativo parece ser mediada por outro mecanismo, o aumento do efluxo deste antibiótico, havendo menor concentração intracelular do fármaco (Lewis, Hooper & Ouellette, 1997). As bombas de efluxo que concedem resistência às quinolonas têm sido identificadas em vários microrganismos, nomeadamente em *S. aureus* (NorA, MepA), (Schwarz & Chaslus-Dancla, 2001).

### **1.3.12 Resistência à Rifampicina**

De modo a poder atingir o seu local de atuação, a rifampicina precisa de atingir o citoplasma bacteriano. Um dos mecanismos de resistência descobertos surge de uma mutação que confere a diminuição da captação do fármaco a partir do meio em que a bactéria se encontra (Hartmann et al., 1985). No entanto, a resistência mais predominantemente encontrada em bactérias a este fármaco surge devido a uma alteração na estrutura da subunidade  $\beta$  da ARN polimerase, codificada pelo gene *rpoB*, causada por uma mutação neste mesmo gene (Wehrli, 1983). A maioria são mutações pontuais, resultando na modificação de um único aminoácido (Floss & Yu, 2005). É pouco o conhecimento que se possui sobre a resistência à rifampicina em *S. pseudintermedius*, visto que isolados resistentes a este fármaco raramente surgem (Kadlec & Schwarz, 2012). No entanto, em estirpes de *S. aureus* e *S. pseudintermedius*, a resistência a este fármaco tem sido relacionada com uma mutação, por modificação de um único par de bases, no gene *rpoB* (Kadlec, van Duijkeren, Wagenaar & Schwarz, 2011). Já foram descritos mais dois mecanismos de resistência, que surgem com menor frequência: diminuição da sensibilidade da ARN polimerase às rifamicinas e modificação do antibiótico (Floss & Yu, 2005).

### **1.3.13 Resistência ao Trimetoprim, Sulfonamidas e associações**

Os mecanismos de resistência às sulfonamidas e ao trimetoprim são semelhantes, e podem resultar de resistência intrínseca, surgindo uma impermeabilização da membrana externa a estes dois compostos, ou de resistência adquirida por mutação cromossomal que causa a sobreprodução dos enzimas alvo dos dois antibióticos (Schwarz & Chaslus-Dancla, 2001). Pode também ocorrer a substituição dos enzimas sensíveis à ação destes antibióticos por outras que lhes são resistentes. O primeiro mecanismo já foi descrito em *P. aeruginosa* (Schwarz & Chaslus-Dancla, 2001). Os outros dois mecanismos destacam-se por serem mais frequentes: excessiva produção do enzima DHFR, no caso do trimetoprim, e da DHPS, no

caso das sulfonamidas; aquisição de plasmídeos que codificam a síntese de DHFR e DHPS resistentes ao trimetoprim e às sulfonamidas, respetivamente (Sousa, 2006).

Na resistência ao trimetoprim destaca-se a aquisição do gene *dfr* que codifica a produção de uma DHFR resistente, pois mostra maior importância na prática clínica (Fluit et al., 2001), visto que as estirpes que apresentam resistência de alto nível possuem este mecanismo de resistência (Lacey, 1982). Este gene parece ser o principal mecanismo de resistência encontrado nas estirpes de *S. pseudintermedius* resistentes a este fármaco (Kadlec & Schwarz, 2012).

Nas sulfonamidas, a aquisição do gene *sul* leva à produção de um enzima DHPS insensível a estes antibióticos (Sousa, 2006). Em estirpes de *S. aureus* resistentes às sulfonamidas já foi igualmente descrita a excessiva produção de PABA (Sousa, 2006). Em *S. pseudintermedius* ainda não foi explicitada a base molecular da resistência a este antibiótico (Kadlec & Schwarz, 2012).

#### **1.4 Situação atual da resistência aos antibióticos em *Staphylococcus* spp. em animais e humanos**

De entre os mecanismos de resistências aqui falados anteriormente, destaca-se a resistência mediada pelo gene *mecA* e *mecC*, conferindo resistência a todos os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. Estes antibióticos são de primeira escolha tanto em Medicina Humana como em Medicina Veterinária. Além disso são considerados pela Organização Mundial de Saúde como antibióticos de último recurso em Medicina Humana (FAO/OIE/WHO, 2008). O aumento da prevalência de estirpes MRSA na população humana parece ter sido a origem da colonização de animais domésticos por estas estirpes, devido à proximidade que se verifica entre estes e os humanos (Weese & van Duijkeren, 2010). O contacto direto entre o animal e o ser Humano parece ser, então, um dos fatores de risco para o aparecimento de animais colonizados por esta estirpe, sendo que esta colonização não significa necessariamente doença (Weese & van Duijkeren, 2010). Desde a primeira descrição de isolamento de estirpes MRSA em animais, tem vindo a aumentar o número de infeções por este agente reportadas um pouco por todo o mundo, principalmente Europa, incluindo Portugal, Canadá, Austrália e os Estados Unidos da América (Weese, 2005). Contudo, a prevalência de animais de companhia colonizados por esta estirpe mantém-se baixa (Weese, 2005). Um facto preocupante sobre o *S. pseudintermedius* é o recente aumento de estirpes MRSP (Kadlec et al., 2010), e

consequentemente a todo o grupo de  $\beta$ -lactâmicos, por aquisição do gene *mecA* (van Duijkeren et al., 2011), sendo que já foram reportados casos deste tipo de estirpes sem suscetibilidade a qualquer grupo de antibióticos autorizados para uso veterinário (Perreten et al., 2010). Animais saudáveis e pessoas que contactam diariamente com animais domésticos podem ser colonizadas por estirpes MRSP, atuando depois como reservatório desta estirpe e perpetuando a sua disseminação (Perreten et al., 2010).

#### **1.4.1 Situação mundial**

A resistência a antibióticos de isolados de *S. pseudintermedius* parece demonstrar padrões que variam com a localização geográfica dos animais afetados. Na Europa e no Japão, estudos demonstraram que as resistências a este agente isolado a partir de infeções cutâneas e auriculares se mantiveram estáveis nas últimas três décadas (Loeffler et al., 2007), enquanto nos EUA, a resistência a certos antibióticos, como a meticilina, tem sido reportada como em constante crescimento (Jones, Kania, Rohrbach, Frank & Bemis, 2007). Tem sido estudada em vários países a prevalência de estirpes MRSP em cães, variando o seu valor entre 0% e 7% dos animais com doenças cutâneas e entre 0% e 4% dos animais saudáveis ou que foram admitidos em ambiente hospitalar (van Duijkeren et al., 2011). Nos EUA, um estudo de Abraham, Morris, Griffeth, Shofer e Rankin (2007), detetou uma prevalência de 4% de gatos saudáveis como portadores de MRSP, sendo que nenhum dos gatos com infeção cutânea apresentava este agente. No Canadá, 1,2% (2 das 161 amostras testadas) dos gatos saudáveis estão colonizados por MRSP (Hanselman, Kruth, Rousseau & Weese, 2009). No Japão foi encontrada uma percentagem de 66,5% de estirpes MRSP (113 dos 170 isolados testados) em dois hospitais de referência, em cães com piodermite (Kawakami et al., 2010). Na Alemanha, num total de 16103 isolados provenientes de animais de companhia e equídeos, a prevalência de estirpes MRSP foi de 0,8% em cães (61/7490), 0,1% em gatos (6/3903) e 0,1% em equídeos (Ruscher et al., 2009). Num estudo de De Lucia et al. (2011) realizado na Itália, foi encontrada uma prevalência de 2% de estirpes MRSP (10 estirpes das 590 estudadas), prevalência essa que é considerada preocupante, visto que apenas em 2007 foi identificada a primeira estirpes MRSP na Europa, ficando a sensação de que esta bactéria se está a disseminar rapidamente pela população canina.

#### **1.4.2 Em Portugal**

Dentro da Europa, Portugal é um dos países com maiores taxas de prevalência de estirpes MRSA em pacientes humanos em ambiente hospitalar (Conceição et al., 2010); já em animais de companhia, a taxa de indivíduos portadores de estirpes MRSA situa-se nos 0,7% em cães e

1,4% em gatos (Couto, Pomba, Moodley & Guardabassi, 2011). A primeira descrição de MRSA em animais em Portugal foi feita em 2009, em suínos (Pomba, Hasman, Cavaco, Fonseca & Aarestrup, 2009). Em 2011, foi feita a primeira descrição de estirpes MRSA em cavalos, podendo estes animais funcionar como reservatório destas estirpes, podendo depois disseminá-las tanto para humanos como para outros animais (Couto, Tilley, Simões, Luis & Pomba, 2011). Quanto à prevalência de estirpes MRSP, em animais de companhia, um estudo de Couto, Pomba, Moodley e Guardabassi (2011) detetou 2 amostras de origem felina das 141 estudadas com resistência à meticilina, sendo que nenhuma era MRSP. Em cães, a prevalência desta estirpe foi de 6,2% (9 em 146 amostras), prevalência essa bastante elevada considerando que estirpes MRSP foram pela primeira vez reportadas em Portugal apenas em 2009 (Couto et al., 2011). Tal como referido anteriormente, também estas estirpes de MRSP eram multirresistentes (Couto et al., 2011).

### **III. Projeto de investigação: Evolução da resistência aos antibióticos em *Staphylococcus* spp. entre 1999 e 2006**

#### **1.1 Objetivos**

O principal objetivo deste estudo foi investigar a prevalência de resistências a vários grupos de antibióticos em estirpes de *Staphylococcus* spp. recolhidas pelo Laboratório de Análises Clínicas da FMV-UL ao longo de um período de oito anos (1999-2006). Um segundo objetivo passou pela identificação de mecanismos de resistência dessas estirpes ao grupo de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, nomeadamente dos genes *mecA* e *mecC*. Para realizar o primeiro objetivo, foi utilizado o teste de suscetibilidade a antibióticos (TSA) pelo método de difusão de disco. Para realizar o segundo objetivo, foi utilizada a técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) e Electroforese em gel de agarose.

#### **1.2 Materiais e métodos**

##### **1.2.1 Caracterização da amostra**

As amostras utilizadas neste estudo foram recebidas pelo Laboratório de Análises Clínicas da FMV-UL, no decurso de um período de oito anos (de 1999 a 2006), e eram provenientes de



animais de várias espécies admitidos em hospitais e clínicas da região de Lisboa. Os isolados foram obtidos de infeções clínicas e enviadas para o laboratório, juntamente com um pequeno formulário com os dados do animal, como a espécie, raça, idade e sexo, e a descrição do clínico sobre o local de recolha da amostra e suspeita de patologia em curso.

### **1.2.2 Extração de ADN**

O protocolo utilizado neste trabalho foi adaptado do protocolo descrito pelo Laboratório de Referência da União Europeia em Resistência Antimicrobiana (disponível em [http://www.eurl-ar.eu/data/images/protocols/pcr\\_spa\\_pvl\\_meca\\_mecc\\_sept12.pdf](http://www.eurl-ar.eu/data/images/protocols/pcr_spa_pvl_meca_mecc_sept12.pdf)), para extração de ADN por fervura em bactérias Gram-positivo. Consistiu em suspender cultura da bactéria em estudo, com o auxílio de uma ansa de 10 µl, em 1 ml de PBS num tubo de centrifugação de 1,5ml, seguido de uma breve passagem pelo agitador. A amostra foi, então, centrifugada durante 5 minutos. Foi descartado o sobrenadante e ressuspendido o sedimento em de TE (10:1). Depois, a amostra foi fervida em banho-maria, a aproximadamente 100°C, durante 10 minutos, sendo que no final desse período fez-se uma passagem de 1 minuto pelo congelador. Por fim, e após a diluição do lisado 10 vezes em TE (10:1), a amostra foi armazenada à temperatura de -20°C.

### **1.2.3 Polymerase Chain Reaction (PCR)**

Esta foi a técnica eleita para proceder à deteção dos genes de interesse, de forma a obter mais informação sobre a identificação dos isolados e de características genotípicas das estirpes que apresentavam certas resistências.

#### **1.2.3.1 Confirmação da espécie**

Foi feita a amplificação do gene *nuc* específico de cada espécie. Para os supostos *S. schleiferi*, *S. pseudintermedius* e *S. intermedius*, a amplificação do gene *nuc* foi realizada através de um multiplex-PCR, adaptado do protocolo descrito por Sasaki et al. (2010). O PCR foi realizado com um volume final de 50 µl contendo água, tampão, cloreto de magnésio (25 mM), dNTPs (25 mM cada), primers sch F, sch R, int F, int R, Pse F e Pse R (10 pmol/µl), 2 µl de ADN e de Dream Taq (Fermentas ThermoScientific, Chicago, Estados Unidos da América). A reação ocorrida no termociclador (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) consistiu numa desnaturação inicial (2 minutos a 95°C) seguida de trinta ciclos de desnaturação (30 segundos a 95°C), hibridação (35 segundos a 56°C) e extensão (60 segundos a 72°C), ocorrendo posteriormente uma única extensão final (2 minutos a 72°C).

#### 1.2.3.2 Identificação do gene *mecA*

Este PCR foi realizado em estirpes cujo TSA revelou resistência à oxacilina. Foi realizado com um volume final de 50 µl contendo água MiliQ, tampão 10x, cloreto de magnésio (25 mM), dNTPs (25 mM), 1 µl de cada primer – *mecA*-1, *mecA*-2, *nuc*-1, *nuc*-2, 16S-1, 16S-2 –, NZYTaq (NZYTech, Lisboa, Portugal) e 2 µl de ADN da estirpe em causa. A reação ocorrida no termociclador (Eppendorf) consistiu numa desnaturação inicial (7 minutos a 94°C) seguida de trinta ciclos de hibridação (5 minutos a 61°C), extensão (60 segundos a 72°C) e desnaturação (60 segundos a 94°C), com uma repetição de hibridação (5 minutos a 61°C) e ocorrendo posteriormente uma única extensão final (5 minutos a 72°C).

#### 1.2.3.3 Identificação do gene *mecC*

Este PCR foi realizado em estirpes cujo TSA revelou resistência à oxacilina. Foi realizado com um volume final de 50 µl contendo água MiliQ, tampão 10x, cloreto de magnésio (25 mM), dNTPs (25 mM cada), 1 µl de cada primer – *dea*-F, *dea*-R, *deb*-F, *deb*-R4 –, Dream Taq (Fermentas) e 2 µl de ADN da estirpe em causa. A reação ocorrida no termociclador (Eppendorf) consistiu numa desnaturação inicial (2 minutos a 95°C) seguida de trinta ciclos de desnaturação (30 segundos a 91°C), hibridação (30 segundos a 56°C) e extensão (60 segundos a 72°C), ocorrendo posteriormente uma única extensão final (2 minutos a 72°C). Um agradecimento especial à Professora Engeline van Duijkeren pela cedência do controlo positivo.

#### 1.2.4 **Teste de suscetibilidade a antibióticos**

Este teste foi realizado através do método de difusão de disco. Uma colónia da bactéria em estudo foi suspensa em 5 ml de cloreto de sódio 0,9%, com o auxílio de uma zaragatoa de algodão. Depois da homogeneização da suspensão, a mesma zaragatoa serviu para semear o inóculo numa placa de agar com Muller-Hinton, procedendo-se depois à colocação dos discos de antibiótico (6 por placa). Os resultados foram lidos e registados após 18 horas de incubação das placas em estufa a 37°C, medindo o diâmetro da zona de inibição, caso estivesse presente, para cada um dos antibióticos utilizados. Esse diâmetro foi depois interpretado de acordo com os critérios clínicos para animais do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008), do *Comité de L'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie* (CA-SFM, 2010) e, quando os critérios não estavam disponíveis para bactérias de origem animal, usou-se os critérios clínicos para humanos do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012).

Os discos de antibióticos (Oxoid, Hampshire, Reino Unido) usados foram os seguintes: ácido fusídico (10 µg), amicacina (30 µg), ampicilina (10 µg), amoxicilina/ácido clavulânico (30 µg), canamicina (30 µg), cefalotina (30 µg), cefotaxima (30 µg), cefovecina (30 µg), ceftriaxona (30 µg), cefoxitina (30 µg) cloranfenicol (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), clindamicina (2 µg), enrofloxacina (5 µg), eritromicina (15 µg), estreptomicina (15 µg), florfenicol (30 µg), gentamicina (10 µg), levofloxacina (5 µg), linezolid (30 µg), moxifloxacina (5 µg), mupirocina (5 µg), neomicina (30 µg), netilmicina (30 µg), nitrofurantoína (300 µg), norfloxacina (10 µg), ofloxacina (5 µg), oxacilina (1 µg), penicilina G (10 units), quinupristina/dalfopristina (15 µg), rifampicina (5µg), sulfamidas (300 µg), teicoplanina (30 µg), tetraciclina (30 µg), tobramicina (10 µg), trimetoprim (5 µg) e trimetoprim/sulfametoxazol (25 µg).

### 1.2.5 Análise estatística

A análise estatística foi efetuada recorrendo ao programa informático SAS 9.3, incluindo apenas as amostras de cão e gato, quanto à espécie, e de ouvido, pele e urina, em relação ao local de recolha, devido ao pequeno número de amostras obtidas das outras espécies. Os fatores de risco foram determinados por regressão logística. As diferenças encontradas foram consideradas significativas quando o valor de  $p \leq 0.05$ . O coeficiente de correlação de Kendall foi utilizado para obter a correlação entre diferentes antibióticos. Quanto ao coeficiente de correlação de Kendall, foi interpretado com base nos seguintes critérios (Landis & Koch, 1977):

Valor de K	Nível de concordância
$\leq 0$	Medíocre
0 – 0.2	Fraco
0.2 – 0.4	Razoável
0.4 – 0.6	Moderado
0.6 – 0.8	Substancial
0.8 – 1	Quase perfeito

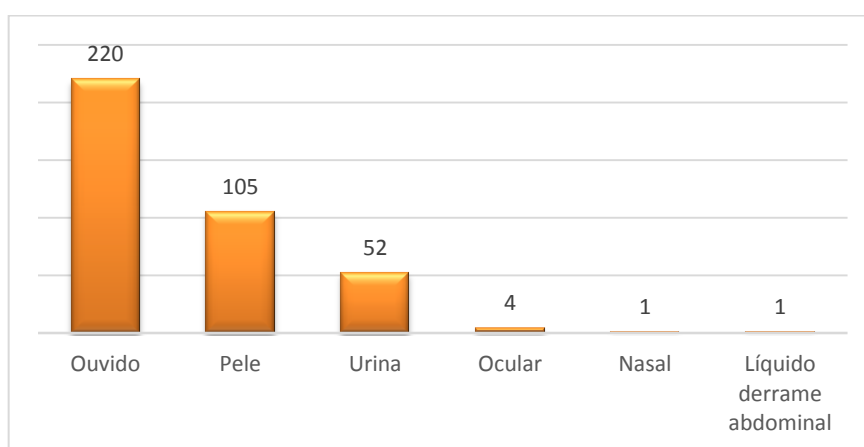
## 1.3 Resultados

### 1.3.1 Descrição da amostra

Este projeto de investigação abrangeu um total de 383 amostras, das quais 335 eram de cão (FR= 87,47%), 41 de gato (FR= 10,70%), 2 de equino (FR= 0,52%), 1 de coelho (FR=

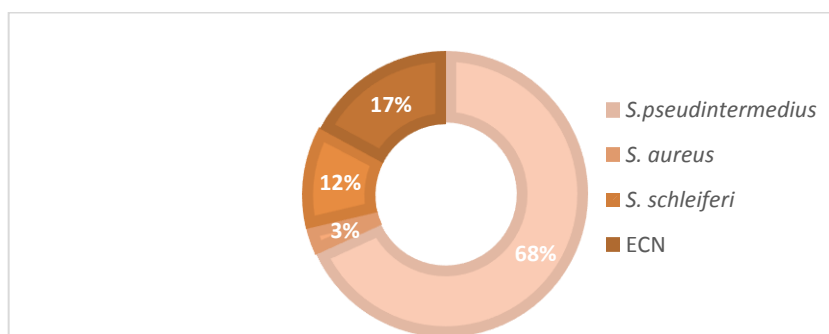
0,26%), 1 de suíno (FR= 0,26%), 1 de porquinho da Índia (FR= 0,26%) e 2 de origem desconhecida (FR= 0,52%). A amostra foi distribuída em 163 fêmeas (FR= 42,56%), 198 machos (FR= 51,70%) e 23 desconhecidas (FR= 5,74%) (Gráfico 2) com uma média de 6,38 ( $\pm 4,20$ ) anos de idade e com um máximo e mínimo de 16 anos e 15 dias, respectivamente. As amostras de zaragatoas auriculares foram as predominantes (Gráfico 1), com 220 amostras (FR= 57,44%), seguidas de 105 amostras de pele (FR= 27,42%), 52 de urina (FR= 13,58%), 4 oculares (FR= 1,04%), 1 nasal (FR= 0,26%) e 1 de líquido de derrame abdominal (FR= 0,26%).

Gráfico 1 – Frequência do local de recolha das amostras.



Quanto à distribuição das estirpes das amostras estudadas (Gráfico 2), houve uma clara predominância de estirpes de *Staphylococcus pseudintermedius*, com 261 amostras (FR= 68,15%), seguidos pelos estafilococos coagulase-negativo com 66 amostras (FR= 17,23%), pelos *S. schleiferi* com 44 amostras (FR= 11,49%) e pelos *S. aureus* com 12 amostras (FR= 3,13%). A distribuição dos isolados que compõem o grupo de ECN encontra-se no anexo II.

Gráfico 2 – Frequência da distribuição de espécies presentes na amostra.



### 1.3.2 Caracterização da resistência no geral

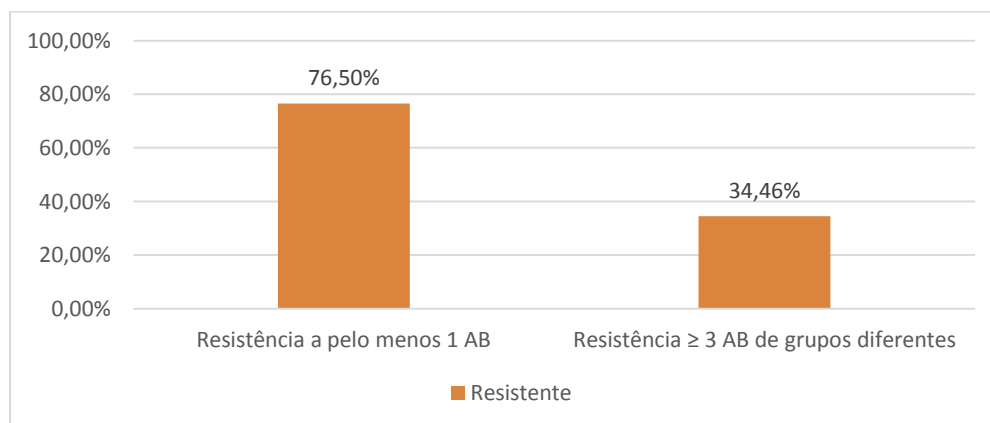
As 383 amostras obtidas neste estudo foram distribuídas por quatro grupos de espécies de estafilococos, estando essa distribuição feita, por ano estudado, na tabela 6.

Tabela 6 – Distribuição das amostras estudadas pelas espécies de estafilococos em estudo e por ano.

Ano	Espécie				Total
	ECN	<i>S. aureus</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. schleiferi</i>	
1999	3	1	10	2	16
2000	3	0	11	2	16
2001	11	2	30	8	51
2002	12	0	49	4	65
2003	10	5	51	10	76
2004	9	1	41	9	60
2005	5	2	42	6	55
2006	13	1	27	3	44
Total	66	12	261	44	383

De entre as 383 amostras, apenas 90 (23,50%) não apresentavam resistência a qualquer um dos antibióticos testados, e das 293 amostras que eram resistentes a pelo menos um antibiótico, 34,46% (132 amostras) eram multirresistentes, ou seja, apresentavam resistência a antibióticos de, pelo menos, três grupos diferentes (Gráfico 3).

Gráfico 3 – Percentagem de isolados resistentes a pelo menos um antibiótico e de isolados resistentes a três ou mais antibióticos de grupos diferentes.



Quando analisamos a distribuição por espécies estudadas, verificamos que a espécie que apresenta maiores frequências relativas e percentagens de resistências a pelo menos um antibiótico e a três ou mais grupos de antibióticos foi o *S. pseudintermedius*.

Tabela 7 – Distribuição da suscetibilidade e da resistência, em frequência e percentagem, das diferentes espécies de estafilococos estudados.

	Pelo menos 1 AB				≤ 3AB de grupos diferentes			
	S		R		S		R	
Espécie	FR	%	FR	%	FR	%	FR	%
ECN	21	31.82%	45	68.18%	47	71.21	19	28.17%
<i>S. aureus</i>	3	25%	9	75%	11	91.67%	1	8.33%
<i>S. pseudintermedius</i>	50	19.16%	211	80.84%	158	60.54%	103	39.46%
<i>S. schleiferi</i>	16	36.36%	28	63.44%	35	79.55%	9	20.45%

1AB – 1 antibiótico; ≤3AB – 3 ou mais antibióticos; S – suscetível; R – resistentes; FR – frequência relativa; % - percentagem; ECN – estafilococos coagulase-negativo.

Dos 37 antibióticos testados, os isolados apenas mostraram 100% de suscetibilidade a 4 deles: cefalotina (Kf), florfenicol (FFC), netilmicina (NET) e teicoplanina (TEC). Na tabela 7 está descrita a distribuição das resistências obtidas aos restantes 33 antibióticos.

Tabela 8 – Distribuição global das resistências obtidas a 33 antibióticos testados, em frequência e em percentagem.

Antibiótico	Frequência de amostras resistentes	Percentagem de amostras resistentes
P	203	53.00%
AMP	203	53.00%
AMC	7	1.83%
FOX	12	3.13%
CTX	5	1.31%
CRO	11	2.87%
CVN	10	2.61%
OX	10	2.61%
CIP	12	3.13%
LEV	12	3.13%
ENR	11	2.87%
NOR	15	3.92%
OFX	15	3.92%
MXF	8	2.09%
TE	122	31.85%
F	3	0.78%

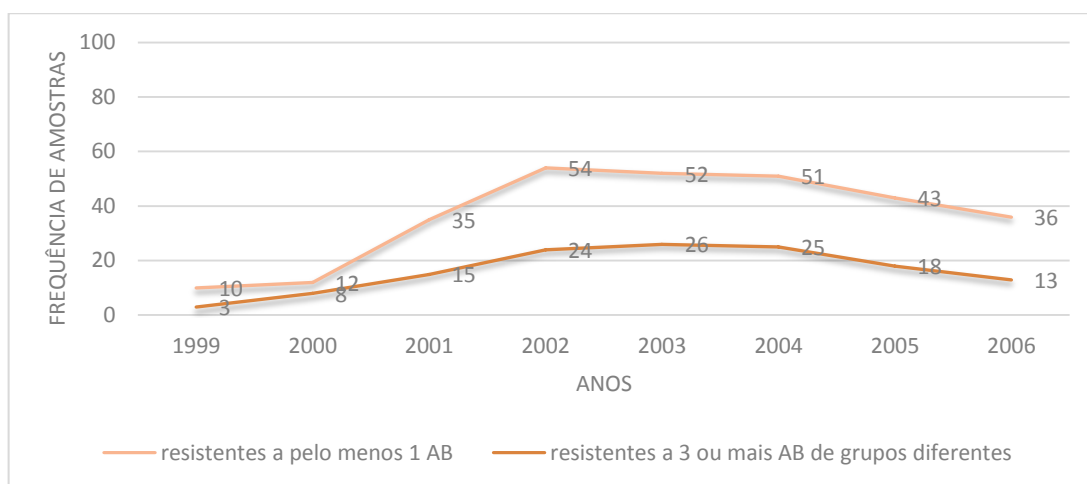
C	13	3.39%
CN	8	2.09%
TOB	8	2.09%
AK	7	1.83%
N	47	12.27%
K	62	16.19%
S	77	20.10%
E	62	16.19%
DA	51	13.32%
FD	24	6.27%
MUP	10	2.61%
SXT	18	4.70%
S3	180	47.00%
W	55	14.36%
LZD	3	0.78%
RD	8	2.09%
QD	4	1.04%

AK – amicacina; AMC – amoxicilina/ácido clavulânico; AMP – ampicilina; C – cloranfenicol; CIP – ciprofloxacina; CN – gentamicina; CRO – ceftriaxona; CTX – cefotaxima; CVN – cefovecina; DA – clindamicina; E – eritromicina; ENR – enrofloxacina; F – nitrofurantoína; FD – ácido fusídico; FOX – cefoxitina; K – canamicina; LEV – levofloxacina; LZD – linezolida; MUP – mupirocina; MXF – moxifloxacina; N – neomicina; NOR – norfloxacina; OFX – ofloxacina; OX – oxacilina; P – penicilina; QD – quinupristina/dalfopristina; RD – rifampicina; S – estreptomicina; SXT – trimetoprim/sulfametoxazole; S3 – sulfonamidas; TE – tetraciclina; TOB – tobramicina; W - trimetoprim

### 1.3.3 Evolução da resistência entre 1999 e 2006

O ano em que se verificou maior percentagem de amostras resistentes a pelo menos um antibiótico, foi 2004. Neste houve 51 amostras resistentes em 60 analisadas (85%). Quando analisamos a resistência a três ou mais antibióticos de grupos diferentes, o ano que reúne maior percentagem é 2000, com 8 amostras multirresistentes das 16 estudadas (50%) (Gráfico 4).

Gráfico 4 – Evolução da frequência de isolados resistentes a pelo menos um antibiótico e de isolados resistentes a três ou mais antibiótico de grupos diferentes, por ano.

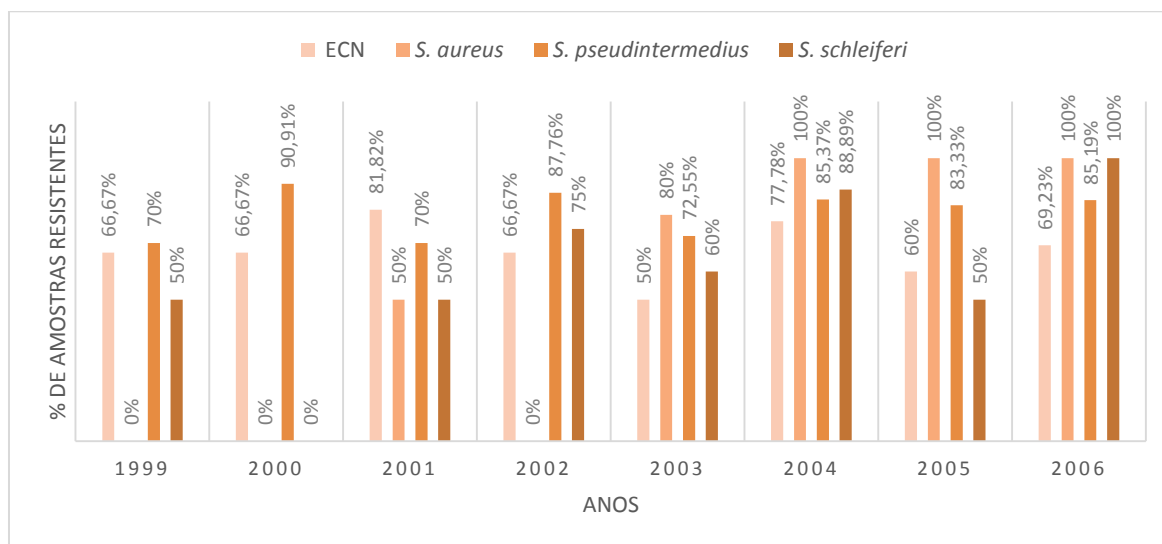


Na generalidade dos anos e das espécies de estafilococos estudados, as maiores percentagens de resistências verificaram-se aos antibióticos do grupo do  $\beta$ -lactâmicos, penicilina e ampicilina (31,25% em 1999; 62,50% em 2000; 50,98% em 2001; 49,23% em 2002; 44,74% em 2003; 61,67% em 2004; 60% em 2005 e 59,09% em 2006). Apenas no ano de 2002, as sulfonamidas ultrapassaram esses antibióticos, com uma percentagem de resistências de 52,31%. Em 1999, a penicilina e ampicilina foram acompanhados pela tetraciclina, pela eritromicina e pelas sulfonamidas no que toca a antibióticos com maior percentagem de resistências (31,25%); em 2003 apenas as sulfonamidas acompanharam os dois  $\beta$ -lactâmicos no topo da lista de antibióticos com maior percentagem de resistências. Apenas a cefalotina, o florfenicol, a netilmicina e a teicoplanina registaram 0% de resistência ao longo de todos os anos. Estes resultados podem ser apreciados no anexo III.



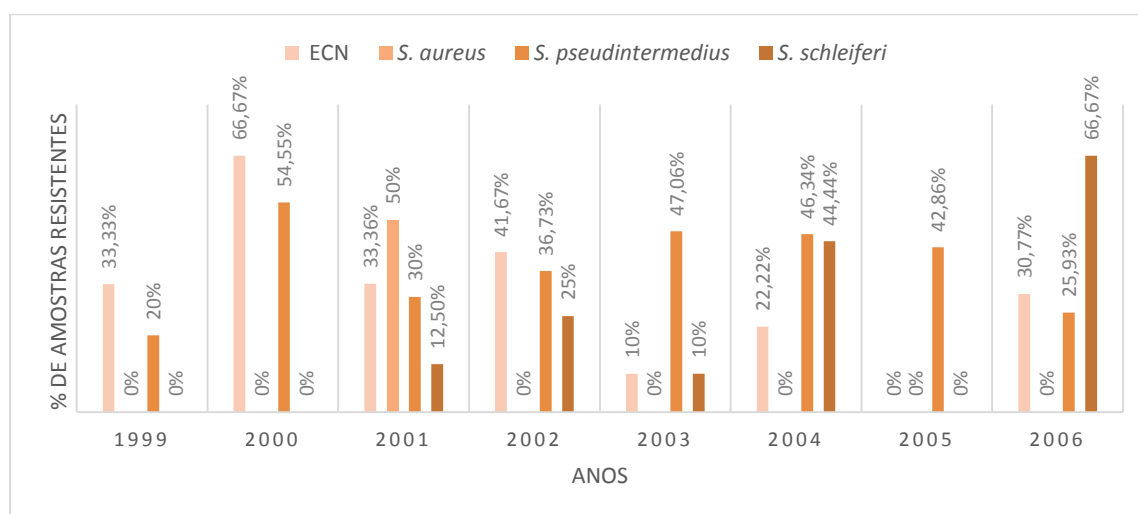
Quando analisamos a resistência a pelo menos um antibiótico ao longo dos anos e tendo em conta a estirpe a que pertencem as amostras analisadas, verificamos que os isolados de *S. pseudintermedius* apresentaram sempre elevadas percentagens de resistências, sendo que o ano que apresentou maior percentagem foi 2000 (Gráfico 5).

Gráfico 5 – Frequência de isolados resistentes a pelo menos um antibiótico, por ano estudado.



Em relação à resistência a três ou mais antibióticos de grupos diferentes (Gráfico 6), não há uma predominância clara de uma só espécie, sendo que nos quatro primeiros anos são os ECN que apresentam maiores percentagens, nos três anos seguintes os isolados de *S. pseudintermedius* e em 2006 os isolados de *S. schleiferi*.

Gráfico 6 – Frequência de isolados estudados resistentes a três ou mais antibióticos de grupos diferentes, por ano estudado.

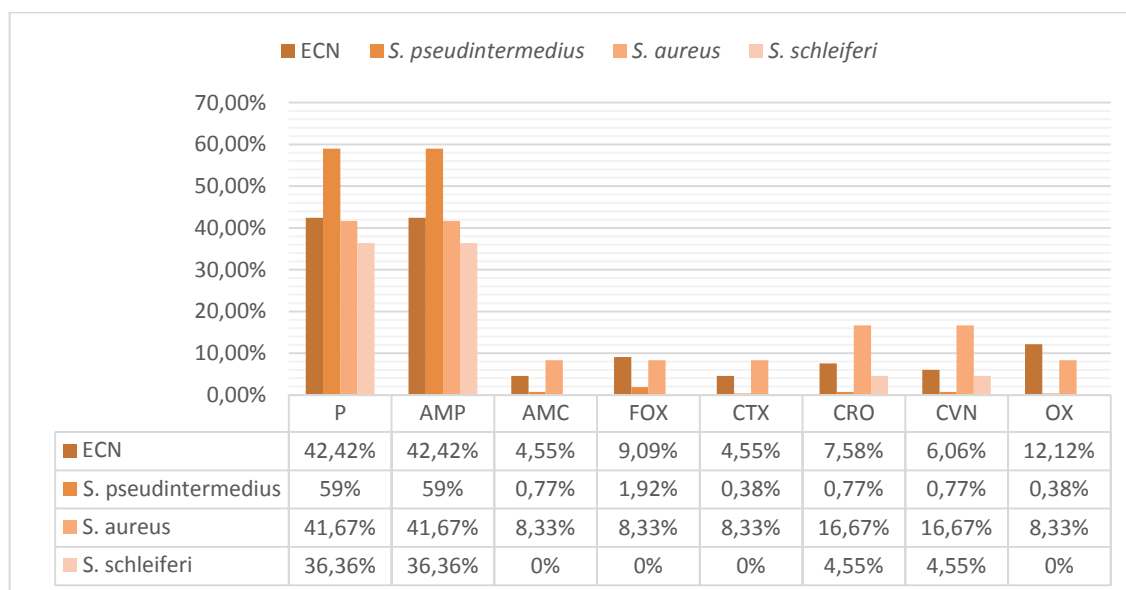


### 1.3.4 Caracterização da resistência por grupo de antibióticos

O grupo de sete gráficos que se seguem ilustram as percentagens de resistências das quatro estirpes estudadas, por grupo de antibióticos estudados.

No grupo dos  $\beta$ -lactâmicos, dos antibióticos testados, a penicilina e ampicilina apresentam as maiores percentagens de resistências nas quatro espécies estudadas. Não se verificaram resistências à cefalotina em qualquer um dos isolados (Gráfico 7).

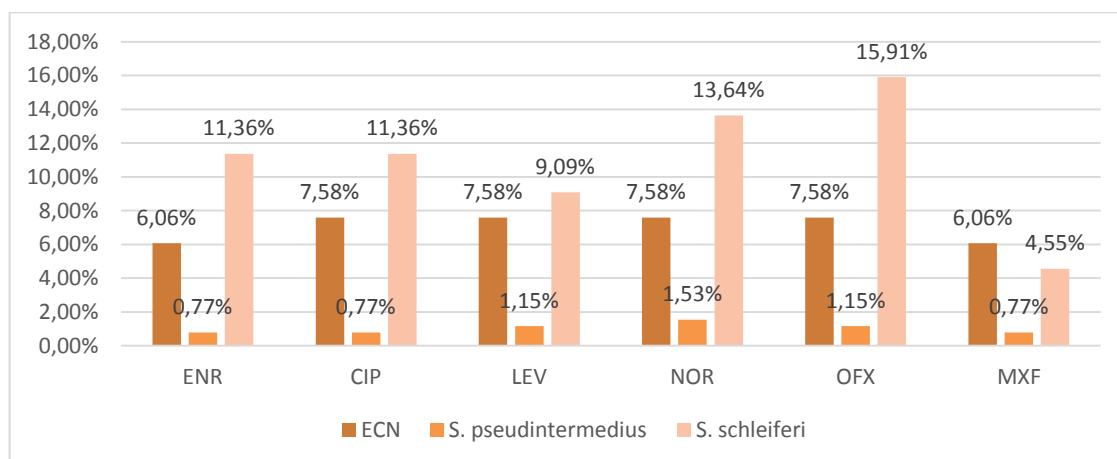
Gráfico 7 – Frequência de resistências das 4 espécies estudadas, aos  $\beta$ -lactâmicos.



AMC – amoxicilina/ácido clavulânico; AMP – ampicilina; CRO – ceftriaxona; CTX – cefotaxima; CVN – cefovecina; FOX – cefoxitina; OX – oxacilina; P - penicilina

No grupo das quinolonas, houve 100% de suscetibilidade dos isolados de *S. aureus*, sendo que nenhum foi resistente a qualquer um dos antibióticos testados deste grupo (Gráfico 8).

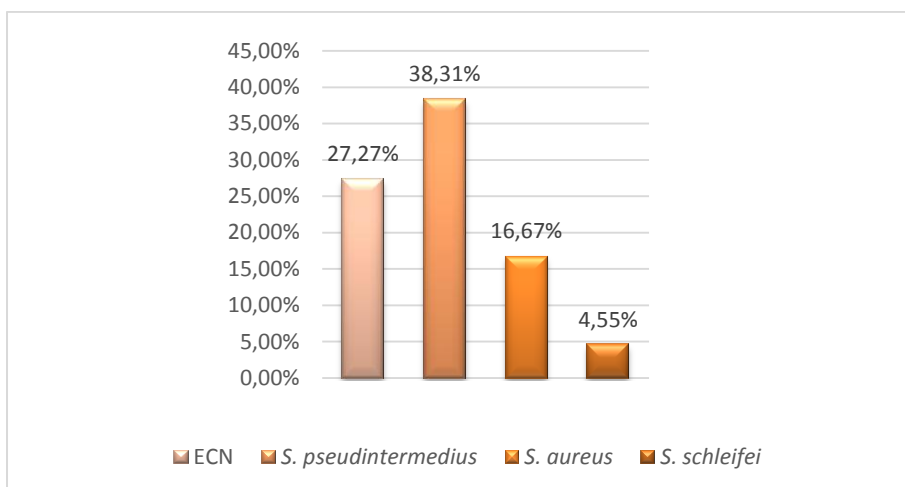
Gráfico 8 – Frequência de resistências das 3 espécies estudadas, às quinolonas.



CIP – ciprofloxacina; ENR – enrofloxacina; LEV – levofloxacina; MXF – moxifloxacina; NOR – norfloxacina; OFX - ofloxacina

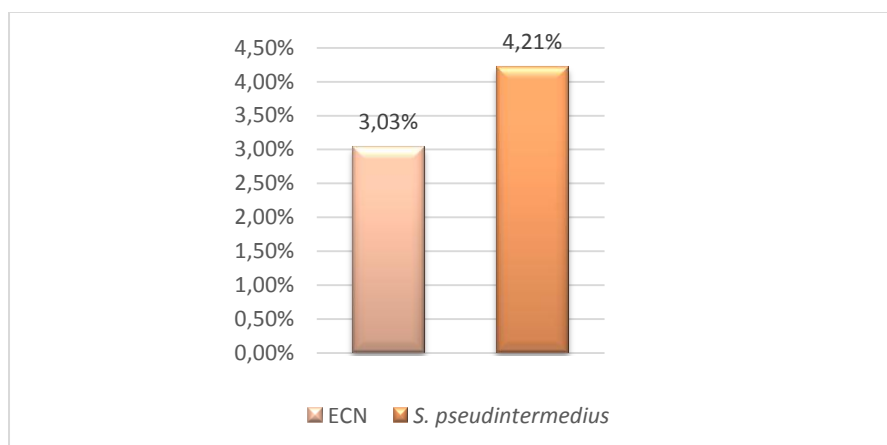
Os isolados de *S. pseudintermedius* foram os com maior percentagem de resistência à tetraciclina (38,31%), seguidos dos ECN (27,27%) (Gráfico 9).

Gráfico 9 – Frequência de resistências das quatro espécies estudadas, à tetraciclina.



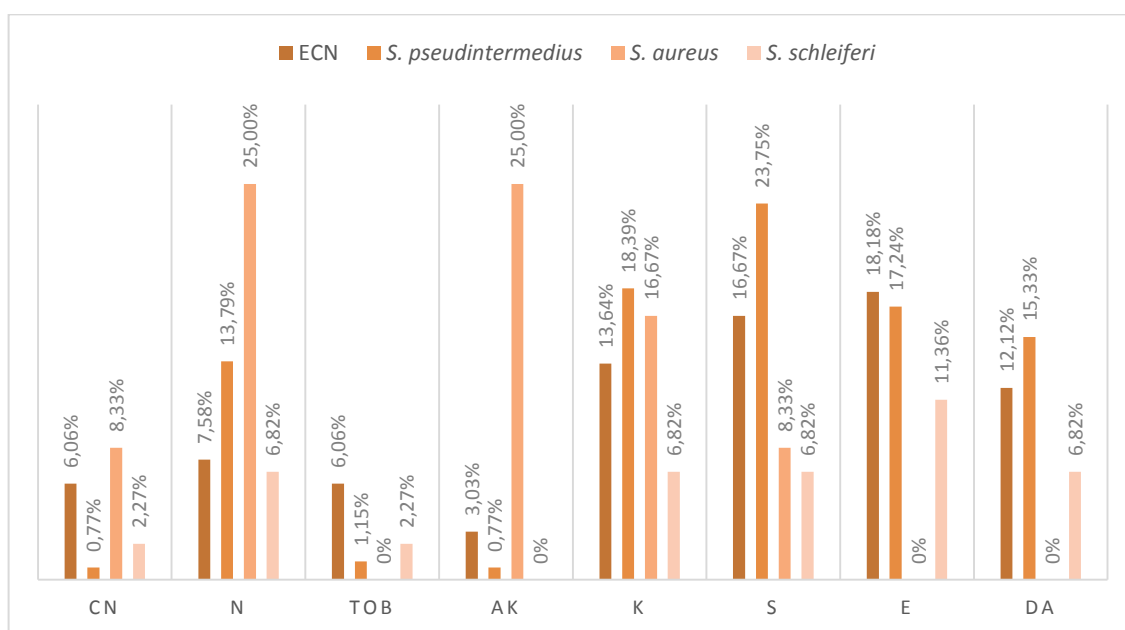
Em relação a este grupo de antibióticos, composto pelo cloranfenicol e florfenicol, só se verificaram resistência no primeiro (Gráfico 10), sendo que essas resistências se distribuíram apenas entre duas das quatro espécies estudadas: os ECN e os *S. pseudintermedius*.

Gráfico 10 – Frequência de resistências das quatro espécies estudadas, ao cloranfenicol.



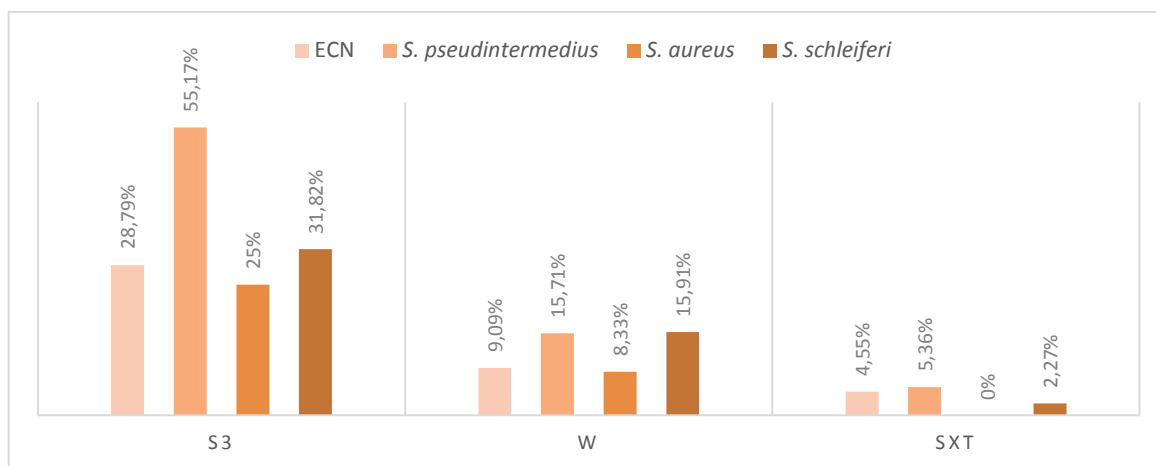
No grupo de antibióticos formado pelos aminoglicosídeos, a eritromicina e a clindamicina, não se verificaram resistências à netilmicina em qualquer uma das quatro estirpes estudadas. As resistências à gentamicina (CN), tobramicina (TOB) e amicacina (AK) foram geralmente baixas. Quanto à neomicina (N), canamicina (K), estreptomicina (S), eritromicina (E) e clindamicina (DA) as percentagens mais preocupantes são as da estirpe *S. pseudintermedius* (Gráfico 11).

Gráfico 11 – Frequência de resistências das 4 espécies estudadas, aos aminoglicosídeos, à eritromicina e à clindamicina.



AK – amicacina; CN – gentamicina; DA – clindamicina; E – eritromicina; K – canamicina; N – neomicina; S – estreptomicina; TOB - tobramicina

Gráfico 12 – Percentagens de resistências das 4 estirpes estudadas, às sulfonamidas, trimetoprim e associação sulfametoxazol/trimetoprim.

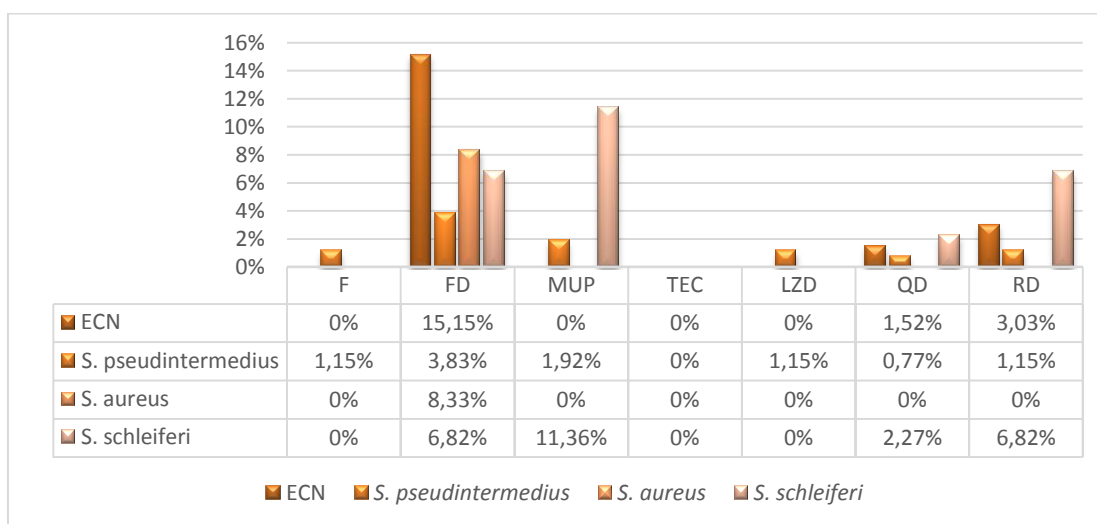


SXT – trimetoprim/sulfametoxazole; S3 – sulfonamidas; W – trimetoprim

Também neste grupo de antibióticos, a estirpe com percentagens mais elevadas de resistência é o *S. pseudintermedius* (Gráfico 12).

Do próximo conjunto de antibióticos, só a teicoplanina (TEC) registou 0% de resistências em qualquer uma das espécies (Gráfico 13). Em alguns antibióticos, como a nitrofurantoína (F) e a linezolida (LZD), apenas se verificaram resistências em isolados de *S. pseudintermedius*, sendo a percentagem de resistências muito baixa (1,15%). Na mupirocina (MUP), quinupristina/dalfopristina (QD) e rifampicina (RD) a estirpe *S. schleiferi* foi a que apresentou percentagens mais elevadas de resistência.

Gráfico 13 – Frequência de resistências das 4 espécies estudadas, à nitrofurantoína, ácido fusídico, mupirocina, teicoplanina, linezolida, quinupristina/dalfopristina e rifampicina .



F – nitrofurantoína; FD – ácido fusídico; LZD – linezolid; MUP – mupirocina; QD – quinupristina/dalfopristina; RD – rifampicina; TEC - teicoplanina

### 1.3.5 Identificação de fatores de risco

Quando comparados com os cães, os gatos apresentaram menor probabilidade de terem um isolado resistente a três ou mais antibióticos ( $P= 0.0283$ ,  $OR= 0.383$ ,  $[0.162-0.903]$ ) e menor probabilidade de ter um isolado de ECN resistente a três ou mais antibióticos ( $P= 0.0234$ ,  $OR= 0.212$ ,  $[0.055-0.811]$ ). Os isolados de *S. pseudintermedius* recolhidos de amostras de urina apresentaram maior probabilidade de ser resistentes a pelo menos um antibiótico do que os *S. pseudintermedius* provenientes de amostras de pele ( $P= 0.0472$ ,  $OR= 0.270$ ,  $[0.074-0.984]$ ).

### 1.3.6 Correlação entre resistências a diferentes antibióticos

Foi analisada a possível existência de correlação de resistências entre diferentes antibióticos que se considerou pertinente saber, com base no coeficiente de correlação de Kendall, formando quatro grupos de antibióticos: grupo 1 – os aminoglicosídeos canamicina (K), neomicina (N), estreptomicina (S), o macrólido eritromicina (E) e a lincosamida clindamicina (DA); grupo 2 – formado pela tetraciclina (TE) e os  $\beta$ -lactâmicos penicilina (P) e ampicilina (AMP); grupo 3 – formado pelas sulfonamidas (S3), trimetoprim (W) e a associação sulfametoxazol/trimetoprim (SXT); e por fim, o grupo 4 – formado pelas quinolonas enrofloxacina (ENR), levofloxacina (LEV), ciprofloxacina (CIP), norfloxacina (NOR), ofloxacina (OFX) e moxifloxacina (MXF). Dentro de cada grupo, os antibióticos foram analisados dois a dois. Os resultados estão descritos no anexo IV. No grupo 1 o coeficiente de correlação situou-se entre o moderado (N com S) e o quase perfeito (E com DA). No grupo 2 a penicilina com a ampicilina obtiveram um coeficiente de 1, quase perfeito; já a relação entre TE e AMP e entre TE e P foi razoável (0.30). No grupo 3 apenas a correlação entre o SXT e S3 é considerada fraca, S3 com W razoável e SXT com W moderada. No grupo 4 as correlações situaram-se entre moderadas (ENR com MXF) e o quase perfeito (LEV com OFX; CIP com ENR; CIP com NOR).

### 1.3.7 Detecção de mecanismos de resistência aos $\beta$ -lactâmicos (genes *mecA* e *mecC*)

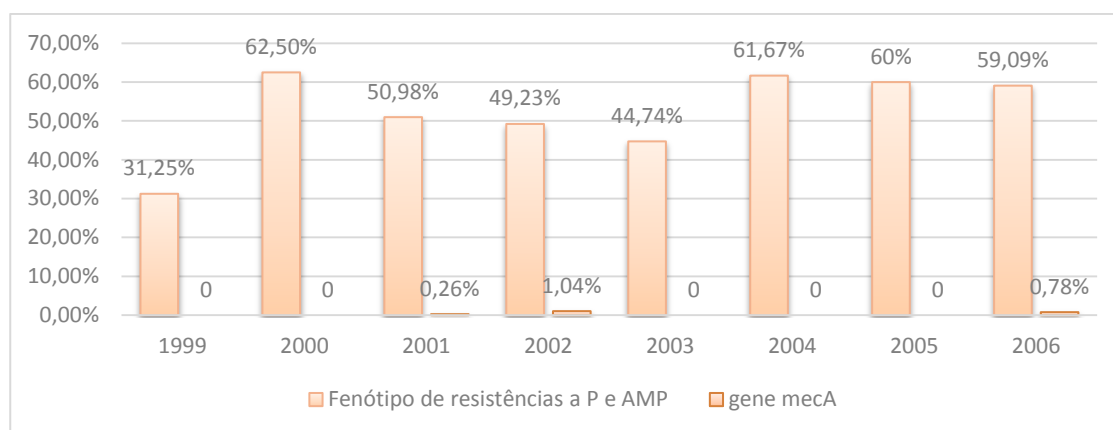
De entre as 10 estirpes que eram resistente à oxacilina no TSA, apenas oito apresentavam o gene *mecA* e nenhuma delas foi positiva para o gene *mecC* (tabela 9). A amostra de *S. aureus* de 2001 constitui a primeira identificação de um MRSA *mecA* positivo de origem animal em Portugal.

Tabela 9 – Resultado do PCR para detecção dos genes *mecA* e *mecC*.

Ano da amostra	Estirpe	Resultado do PCR gene <i>mecA</i>	Resultado do PCR gene <i>mecC</i>
1999	ECN	Negativo	Negativo
2001	<i>S. aureus</i>	<b>Positivo</b>	Negativo
2002	ECN	<b>Positivo</b>	Negativo
2002	ECN	<b>Positivo</b>	Negativo
2002	ECN	<b>Positivo</b>	Negativo
2002	ECN	<b>Positivo</b>	Negativo
2004	<i>S. pseudintermedius</i>	Negativo	Negativo
2006	ECN	<b>Positivo</b>	Negativo
2006	ECN	<b>Positivo</b>	Negativo
2006	ECN	<b>Positivo</b>	Negativo

No gráfico 14 é possível apreciar a percentagem de isolados que apresentavam fenótipo de resistência à penicilina e ampicilina e quando começaram a aparecer estirpes que possuíam o gene *mecA*.

Gráfico 14 – Relação entre o fenótipo de resistência à penicilina e ampicilina e o aparecimento de estirpes com o gene *mecA*.



## 1.4 Discussão

Em Portugal, já foram feitos estudos sobre os padrões de resistência a antibióticos e mecanismos envolvidos para várias bactérias, como os enterococos, campylobacter e *Escherichia coli*. Em estafilococos, os estudos existentes foram maioritariamente provenientes de Medicina Humana, com amostras de *S. aureus*, e os que existem com amostras de origem animal concentram-se mais na deteção de estafilococos meticilina resistente (MRS). O estudo aqui realizado constitui o primeiro estudo a utilizar um número tão grande de amostras de origem animal (383), recolhidas ao longo de um período de tempo tão extenso (entre 1999 e 2006) e a testar um tão variado número de antibióticos (37). A nossa amostra foi composta por estirpes recolhidas principalmente de cães (87,47%) e a maioria dos isolados classificados como *S. pseudintermedius* (68,15%), sendo três os locais mais comuns de recolha das amostras, nomeadamente ouvido (57,44%), pele (27,42%) e urina (13,58%). Estes dados estão perfeitamente de acordo com a literatura, visto o *S. pseudintermedius* ser o que mais frequentemente se encontra envolvido em infeções em várias espécies de animais, mas principalmente em cães (Kadlec & Schwarz, 2012) e ser o principal agente de piodermites em cães, estando também associado a infeções urinárias e otites (Weese & van Duijkeren, 2010). De entre as 383 amostras, apenas 90 (23,50%) não apresentavam resistência a qualquer um dos antibióticos testados, o que fica bastante aquém dos resultados obtidos no estudo de

Vanni et al., 2009, que obteve 70,5% das 122 amostras testadas de *S. intermedius* e *S. schleiferi* sensíveis a 23 antibióticos testados. Esta diferença de resultados pode dever-se ao facto de o nosso estudo ter usado uma maior variedade de grupos de antibióticos e de espécies de estafilococos. A frequência de resistência a pelo menos um antibiótico (76,5%) e a três ou mais grupos de antibióticos (34,46%) são bem mais animadoras do que os obtidos num estudo semelhante de Penna, Varges, Martins, Martins & Lilenbaum (2010) em que as percentagens obtidas foram, respetivamente, 100% e 77,1%. Isto pode dever-se ao facto do nosso estudo ser anterior à emergência de estirpes MRSP em animais (2009) em Portugal, estirpes estas que, por serem possuidoras de vários genes de resistência, os disseminam na população bacteriana.

Ao analisarmos a distribuição por espécies estudadas, *S. pseudintermedius* apresenta uma percentagem de 80,84% de resistências a pelo menos um antibiótico e de 39,46% a três ou mais grupos de antibióticos diferentes. Comparando com valores obtidos num estudo de Couto, Belas, Couto, Perreten & Pomba (2013) que usou 40 estirpes de *S. pseudintermedius* recolhidas na mesma área geográfica do nosso estudo (Hospital escolar da FMV e clínicas dos arredores de Lisboa), num período posterior ao nosso (entre 2007 e 2011), a resistência a pelo menos um antibiótico é semelhante à nossa (80%), mas a resistência a três ou mais grupos de antibióticos foi um pouco superior, 55%. Os resultados de ambos os estudos contradizem o que está descrito na maioria dos estudos, em que estirpes de *S. pseudintermedius* sensíveis à meticilina são na sua maioria apenas resistentes à ampicilina e a outro grupo de antibióticos (Couto et al., 2013). Em relação aos ECN, os valores de resistência obtidos no presente estudo são superiores aos obtidos num estudo de Sampimon et al. (2011) em que 40,6% das amostras eram resistentes a pelo menos um antibiótico e 10,6% resistentes a vários grupos de antibióticos (no nosso estudo as percentagens foram, respetivamente, 68,18% e 28,17%). Quanto aos *S. schleiferi* comparando de novo com o estudo de Vanni et al. (2009) a percentagem de estirpes resistentes a pelo menos um antibiótico (63,44%) descrita no presente estudo é semelhante à obtida naquele (62,5%), mas a percentagem de resistência a três ou mais grupos de antibióticos diferentes do presente estudo foi muito superior (20,45% vs 0%). Em relação aos *S. aureus*, num estudo semelhante mas que usou apenas amostras de urina de cão, os *S. aureus* obtidos apresentaram 100% de resistência a um antibiótico (versus os nossos 75%) e 37,5% de resistências a três ou mais grupos de antibióticos (valor que no nosso estudo foi bastante inferior, 8,33%) (Penna et al., 2010). Para avaliar as diferenças obtidas entre o nosso estudo e os outros com os quais foram comparados, temos de ter em mente que os padrões de resistência bacteriana variam com a área geográfica (Loeffler et al., 2007) e que o número de antibióticos e de grupos de antibióticos testados no nosso estudo foi bastante



superior a qualquer outro, aumentando, assim, a probabilidade dos isolados serem resistentes a pelo menos um antibiótico.

A ampicilina e penicilina são os antibióticos que apresentam maiores taxas de resistência, 53% de resistências, o que seria de esperar por serem dos  $\beta$ -lactâmicos mais antigos e cujas resistências surgiram pouco após a sua introdução na prática clínica. O segundo e terceiro antibióticos com maior percentagem foram as sulfonamidas (47%) e a tetraciclina (31,85%). As sulfonamidas, em geral, não são frequentemente testadas, sendo mais comum encontrar em estudos a resistência à associação sulfametoxazol/trimetoprim. Quanto às tetraciclinas, tal como a ampicilina e penicilina, costumam estar no topo das resistências em estudos deste tipo, tanto em isolados de origem animal como humana.

Quando avaliamos a distribuição das amostras ao longo do tempo, verificamos que em 2002 temos o maior número recolhido de estirpes resistentes a pelo menos um antibiótico, e é este também o ano em que se verifica o pico de resistências na maioria dos antibióticos (cefotaxima, cefovecina, enrofloxacin, ciprofloxacin, levofloxacin, norfloxacin, ofloxacin, moxifloxacin, gentamicin, tobramicin, estreptomicin, sulfametoxazole/trimetoprim, trimetoprim e linezolida). O pico de resistências dos antibióticos que mostraram maior percentagem de resistências foi em 2000 no caso da penicilina, ampicilina e tetraciclinas, enquanto para as sulfonamidas foi em 2005. A tendência verificada no nosso estudo da penicilina e ampicilina manterem elevados valores de resistência contradiz um estudo de Prescott, Hanna, Reid-Smith & Drost (2001) anterior ao nosso (entre 1984-1998), em que se verificava uma tendência para a descida das taxas de resistência a estes antibióticos.

Ao analisarmos as resistências no grupo dos  $\beta$ -lactâmicos, verificamos que as maiores percentagens de resistência se verificam à penicilina e ampicilina nos isolados *S. pseudintermedius*, embora todas as outras espécies possuam também percentagens de resistência já consideradas elevadas. Comparando com outros estudos, as percentagens de resistência do *S. pseudintermedius* (Pedersen et al., 2007) e dos ECN (Werckenthin, Cardoso, Martel & Schwarz, 2001) são semelhantes, mas as dos *S. schleiferi* (36,36% vs 60%) (Jones et al., 2007) e dos *S. aureus* (41,67% vs 75%) (Penna et al., 2010) ficam ainda um pouco abaixo. Quanto aos outros antibióticos deste grupo, as percentagens de resistência foram bastante baixas, de realçar a baixa percentagem de resistências à amoxicilina com ácido clavulânico, um antibiótico bastante usado em prática clínica, mas cujas resistências se têm mantido baixas também noutros estudos (Pedersen et al., 2007; Jones et al., 2007; Vanni et al., 2009), sendo que essa mesma tendência se verifica em estirpes de *S. aureus* de humanos (Fluit, Wielders,

Verhoef & Schmitz, 2001). A clara diferença de percentagem de resistências que existe entre a ampicilina e penicilina e os restantes  $\beta$ -lactâmicos testados deve-se à existência de dois mecanismos de resistência distintos em estafilococos a este grupo de antibióticos. Por um lado, temos as  $\beta$ -lactamases, que conferem um fenótipo de resistência à penicilina e ampicilina e podem ou não conferir resistência à amoxicilina com ácido clavulânico; por outro, temos o gene *mecA*, que confere um fenótipo de resistência a todos os  $\beta$ -lactâmicos, não devendo, então, ser usado nenhum antibiótico deste grupo. As resistências à oxacilina mantêm-se bastante baixas, exceto nas estirpes de ECN e *S. aureus*, estirpes essas onde descobrimos algumas que eram positivas ao gene *mecA*.

O grupo das quinolonas é composto por fármacos cuja sua principal utilização em clínica é no combate das ITU. Assim, como os ECN são dos agentes que mais encontramos nestas infeções tanto em humanos (Livermore, 2000) como em pequenos animais (Penna et al., 2010), seria de esperar que fossem estes os que apresentavam maiores percentagens de resistência. A total suscetibilidade dos nossos *S. aureus* às quinolonas pode dever-se ao facto desta espécie estar menos vezes envolvida em ITU, sendo este facto suportado pelo estudo de Penna et al. (2010) em que esta foi a espécie menos frequente em ITU de cães.

A resistência ao cloranfenicol foi bastante baixa e surgiu apenas nas espécies mais representadas, o *S. pseudintermedius* e ECN, refletindo o facto de não estarem licenciados para uso em Medicina Veterinária.

No grupo dos aminoglicosídeos, verificaram-se percentagens de resistência semelhantes à neomicina, estreptomicina e canamicina, isto porque, como vamos ver adiante, existe uma forte correlação entre a resistência a estes antibióticos. Quanto à amicacina, é o que apresenta percentagens mais baixas de resistência neste grupo, exceto aos *S. aureus*, o que pode traduzir a existência de utilização deste antibiótico ao abrigo da “cascata” em situações mais complicadas.

As percentagens de resistência à eritromicina e clindamicina foram bastante semelhantes, o que está de acordo com a correlação quase perfeita obtida entre estes dois antibióticos na análise estatística.

As sulfonamidas são um antibiótico que caiu em desuso devido à disseminação do mecanismo de resistência a este antibiótico (Sköld, 2000), assim como comprovam os nossos resultados (55,17% de resistências em *S. pseudintermedius*). A associação entre trimetoprim e sulfametoxazol, apesar de apresentar baixos níveis de resistência no nosso estudo, deve ser

bem ponderada a sua utilização, visto que há estudos em que a sua resistência em *S. pseudintermedius* pode chegar aos 50% (Couto et al., 2013).

A resistência ao ácido fusídico é, por um lado surpreendente, pois é um antibiótico que é reservado para a descolonização em humanos (Couto et al., 2011). Tal pode ser justificado pela aplicação frequente de uma vasta gama de pomadas que hoje em dia são utilizadas em Medicina Veterinária, prática esta que pode levar à disseminação de resistências.

Quanto aos outros antibióticos analisados, as baixas resistências refletem o seu desuso (nitrofurantoína), o facto de serem antibióticos mais utilizados na descolonização de humanos (mupirocina) ou o facto de serem antibióticos de último recurso contra MRSA em Medicina Humana (quinupristina/dalfopristina, linezolida, rifampicina e teicoplanina).

Quando comparados com os cães, os gatos apresentaram menor probabilidade de terem um isolado resistente a três ou mais antibióticos ( $P= 0,0283$ ,  $OR= 0,383$ ,  $[0,162-0,903]$ ) e menor probabilidade de ter um isolado de ECN resistente a três ou mais antibióticos ( $P= 0,0234$ ,  $OR= 0,212$ ,  $[0,055-0,811]$ ). Podem ser ponderadas várias explicações para estes resultados. Um delas está relacionada com as diferenças metabólicas que existem entre cães e gatos, sendo que alguns antibióticos, como por exemplo a enrofloxacina, são prescritos para cães, mas não o são tão frequentemente em gatos, sendo as bactérias destes últimos sujeitos à ação de um menor número de antibióticos. Podemos também pensar na maior dificuldade de administração de medicação oral em gatos em relação aos cães. Os isolados de *S. pseudintermedius* recolhidos de amostras de urina apresentaram maior probabilidade de ser resistentes a pelo menos um antibiótico do que os *S. pseudintermedius* provenientes de amostras de pele ( $P= 0,0472$ ,  $OR= 0,270$ ,  $[0,074-0,984]$ ). Novamente, podemos pensar em várias explicações para este resultado. A diferença pode dever-se ao facto de existirem menos antibióticos que têm ação no trato urinário, logo as bactérias nesse aparelho são sujeitas à ação de um número limitado de antibióticos, sendo que as quinolonas pertencem ao grupo de antibióticos mais usados neste trato, enquanto as bactérias da pele estão sujeitas a um grande número de antibióticos de grupos diferentes. Outra explicação possível é o facto de o período de terapêutica aplicável às afeções do trato urinário ser bastante inferior ao das afeções dermatológicas.

Na correlação entre resistências a diferentes antibióticos, apenas foi obtida uma correlação total entre a ampicilina e a penicilina, o que era esperável, já que partilham o mesmo mecanismo de resistência, não havendo por isso bactérias resistentes a um antibiótico e não a outro. Dos outros antibióticos testados, os que merecem discussão por obterem valores

aceitáveis de correlação é o grupo das quinolonas, em que a correlação entre eles variou entre o moderado e o quase perfeito. O grupo que envolve alguns aminoglicosídeos, e a eritromicina e a clindamicina apresentou igualmente valores de correlação que variaram entre o moderado e o quase perfeito. No primeiro caso, os resultados são os esperados, pois a mutação que ocorre e confere resistência a uma quinolona é a mutação necessária para conferir resistências às outras quinolonas, mesmo de diferentes gerações. No caso da moxifloxacina, que foi a que obteve valores de correlação um pouco inferiores, deve-se, provavelmente, ao facto de ser necessária uma mutação adicional, num gene diferente, para que haja resistência. No segundo grupo analisado, a correlação obtida foi também a esperada, baseado em resultados obtidos noutros estudos em que houve completa correlação entre a eritromicina e alguns aminoglicosídeos (Boerlin, Burnens, Frey, Kuhnert & Nicolet, 2001); entre a clindamicina e a eritromicina a correlação também foi a esperada, visto que existem genes de resistência à eritromicina que quando expressos constitutivamente também conferem resistência à clindamicina (Robert et al., 1999).

Uma limitação que pode ser apontada ao nosso estudo é o facto de os dados não serem mais atuais, visto as amostras serem referentes ao período entre 1999 e 2006, não refletindo um problema em crescimento em Portugal e um pouco por todo o mundo: a elevada prevalência de estirpes MRSP. Neste estudo, não foram encontrados animais com *S. pseudintermedius mecA* positivo, o que seria de esperar visto que o nosso período de estudo foi anterior à primeira identificação de MRSP na Europa (Loeffler et al., 2007) e em Portugal (Pomba et al., 2009), em 2007 e 2009 respetivamente. De entre as 383 amostras, apenas uma era MRSA (0,26%), estando de acordo com o descrito na literatura, visto que infeções causadas por MRSA em animais são pouco comuns (Duquette & Nuttall, 2004). A amostra pertencia a um gato, sendo assim a prevalência de MRSA nessa espécie animal de 2,4% no nosso estudo, ficando um pouco acima da prevalência de 1,4% obtida no estudo de Couto et al. (2011) em que foram encontrados dois MRSA entre 141 amostras provenientes de gatos. A descoberta desta estirpe MRSA *mecA* positivo em 2001 no presente estudo faz com que esta seja a primeira descrição de uma estirpe de *S. aureus mecA* positivo de origem animal em Portugal. A primeira descrição de ECN metilina-resistente possuindo o gene *mecA* foi feita em 1996 em galinhas (Kawano et al., 1996), em que 72 das 280 galinhas do estudo (25,7%) possuíam uma estirpe de ECN metilina-resistente. No presente estudo, foram detetadas 8 amostras de ECN metilina-resistente em 66 estudadas (12,12%), sendo 7 delas *mecA* positivo (10,6%), um pouco abaixo dos 14,1% de ECN *mecA* positivos descritos num estudo desta estirpe em

mastites de bovinos (Sampimon et al., 2011). No presente estudo reportamos a detecção dos primeiros ECN *mecA* positivo em Portugal, no ano de 2002.

## 1.5 Conclusão

Este estudo vem realçar a importância de uma antibioterapia baseada na identificação da estirpe em causa e dos seus padrões de resistência e suscetibilidade aos antibióticos, isto porque existem diversos padrões de resistência para isolados da mesma espécie e para estirpes diferentes da mesma bactéria (Vanni et al., 2009), sendo por isso importante o clínico conhecer melhor a bactéria que está a combater. O facto de as resistências terem vindo a aumentar em alguns grupos de antibióticos, como é o caso das quinolonas, serve de impulso para o clínico procurar alternativas, como rebuscar antigas opções de tratamento, como o uso da nitrofurantoína no tratamento de infeções urinárias (Pomba, Couto & Moodley, 2010). A prevalência de MRSP obtida neste estudo não reflete o real problema que o clínico tem em mãos quando nos surge um animal infetado por MRSP. Isto porque, os antibióticos aos quais os *S. pseudintermedius* permanecem com baixas taxas de resistência não estão licenciados para a prática veterinária (amicacina, nitrofurantoína e cloranfenicol) ou são considerados de último recurso para o tratamento das MRSA em humanos (linezolida, quinupristina/dalfopristina, rifampicina e teicoplanina), constituindo o seu uso ao abrigo da cascata um dilema ético (Couto et al., 2011). Fica, assim, a ideia da necessidade da existência de um eficaz programa de monitorização das resistências bacterianas e de uma melhor educação do clínico no que toca à escolha do antibacteriano a usar e do real impacto da escolha por uma antibioterapia empírica.

## IV. Bibliografia

- Abraham, J. L., Morris, D. O., Griffeth, G. C., Shofer, F. S. & Rankin, S. C. (2007). Surveillance of healthy cats and cats with inflammatory skin disease for colonization of the skin by methicillin-resistant coagulase-positive staphylococci and *Staphylococcus schleiferi* spp. *Veterinary Dermatology*, 4, 252-259.
- Anvisa. (2007). Mecanismos de acção. em *Agência Nacional de Vigilância Sanitária*. Acedido em Set. 2, 2013. Disponível em [http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede\\_rm/cursos/rm\\_controle/opas\\_web/modulo1/pop\\_mecanismo.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/pop_mecanismo.htm)
- Barg, N., Chambers, H. & Kernodle, D. (1991). Borderline susceptibility to antistaphylococcal penicillins is not conferred exclusively by the hyperproduction of beta-lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35, 1975-1979.
- Berger-Bachi, B. (1994). Expression of resistance to methicillin. *Trends in Microbiology*, 2, 389-393.
- Boerlin, P., Burnens, A. P., Frey, J., Kuhnert, P. & Nicolet, J. (2001). Molecular epidemiology and genetic linkage of macrolide and aminoglycoside resistance in *Staphylococcus intermedius* of canine origin. *Veterinary Microbiology*, 79, 155-169.
- Bongiorno, D., Campanile, F., Mongelli, G., Baldi, M. T., Provenzani, R., Reali, S., . . . Stefani, S. (2010). DNA methylase modifications and other linezolid resistance mutations in coagulase-negative staphylococci in Italy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65, 2336-2340.
- Brown, E. M. & Thomas, P. (2002). Fusidic acid resistance in *Staphylococcus aureus* isolates. *The Lancet*, 359, 803.
- Brown, G. M. (1962). The biosynthesis of folic acid. *The Journal of Biologic Chemistry*, 237, 536-540.
- Bushby, S. M. (1975). Sinergy of trimethoprim-sulfamethoxazole. *Canadian Medical Association Journal*, 112, 63-66.
- Bushby, S. R. & Hitchings, G. H. (1968). Trimethoprim, a sulphonamide potentiator. *British Journal of Pharmacology*, 33, 72.
- Chopra, I. & Roberts, M. (2001). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65, 232-260.

- Chopra, I. & Roberts, M. C. (2001). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65, 232-260.
- Chopra, I., Hawkey, P. M. & Hinton, M. (1992). Tetracyclines, molecular and clinical aspects. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 29, 245-277.
- Clancy, J., Dib-Hajj, F., Petitpas, J. W. & Yuan, W. (1997). Cloning and characterization of a novel macrolide efflux gene, *mreA*, from *Streptococcus agalactiae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41, 2719-2723.
- CLSI (2008). Clinical Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals. Approved Standard: Third Edition M31-A3. CLSI, Wayne, PA, USA.
- CLSI (2012). Clinical Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated from Animals. Approved Standards: M100-S22. CLSI, Wayne, PA, USA.
- Cookson, B. (1998). The emergence of mupirocin resistance: a challenge to infection control and antibiotic prescribing practice. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 41, 11-18.
- Courter, R. D. & Galton, M. M. (1962). Animal staphylococcal infections and their public health significance. *American Journal of Public Health*, 52, 1818-1827.
- Couto, N., Belas, A., Couto, I., Perreten, V. & Pomba, C. (2013). Genetic relatedness, antimicrobial and biocide susceptibility comparative analysis of methicillin-resistant and –susceptible *Staphylococcus pseudintermedius* from Portugal. *Microbiology Drug Resistance*.
- Couto, N., Pomba, C., Moodley, A. & Guardabassi, L. (2011). Prevalence of methicillin-resistant staphylococci among dogs and cats at a veterinary teaching hospital in Portugal. *Veterinary Record*, 169, 72.
- Couto, N., Tilley, P., Simões, J., Luis, J. P. & Pomba, C. (2011). First report of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST5 and ST398 from purebred Lusitano horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 32, 300-304.
- Cox, H. U., Hoskins, J. D., Newman, S. S., Foil, C. S., Turnwald, G. H. & Roy, A. F. (1988). Temporal study of staphylococcal species on healthy dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 49, 747-751.
- Davies, J. & Wright, G. (1997). Bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics. *Trends in Microbiology*, 5, 234-240.
- De Lucia, M., Moodley, A., Latronico, F., Giordano, A., Caldin, M., Fondati, A. & Guardabassi, L. (2011). Prevalence of canine methicillin resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in a veterinary diagnostic laboratory in Italy. *Research in Veterinary Science*, 91, 346-348.
- Dobie, D. & Gray, J. (2004). Fusidic acid resistance in *Staphylococcus aureus*. *Archives of Disease in Childhood*, 89, 74-77.
- Doi, Y. & Arakawa, Y. (2007). 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clinical Infectious Diseases*, 45, 88-94.

- Duquette, R. A. & Nuttall, T. J. (2004). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dogs and cats: an emerging problem? *Journal of Small Animal Practice*, 45, 591-597.
- Ertek, M., Yazgi, H., Aktas, E., Ayyildiz, A. & Parlak, M. (2003). Sensitivity of methicillin resistant staphylococci to linezolid and some other antimicrobial agents. *Mikrobiyoloji Bulteni*, 37, 235-240.
- European Antimicrobial Resistance Surveillance System (2009) EARSS annual report 2008. EARSS, Bilthoven, The Netherlands. Acedido a Set. 21, 2013. Disponível em [http://www.rivm.nl/earss/Images/EARSS%202008\\_final\\_tcm61-65020.pdf](http://www.rivm.nl/earss/Images/EARSS%202008_final_tcm61-65020.pdf)
- FAO/OIE/WHO (2008). Joint FAO/WHO/OIE Expert Meeting on Critically Important Antimicrobials. *Report of the FAO/WHO/OIE Expert meeting*, FAO, Rome, Italy, 26–30 November 2007.
- Fines, M., Perichon, B., Reynolds, P., Sahm, D. F. & Courvalin, P. (1999). VanE, a new type of acquired glycopeptide resistance in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43, 2161-2164.
- Floss, H. G. & Yu, T. (2005). Rifamycins - mode of action, resistance and biosynthesis. *Chemical Reviews*, 105, 621-632.
- Fluit, A. C., Visser, M. R. & Schmitz, F.-J. (2001). Molecular detection of antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 14, 837-871.
- Fluit, A. C., Wielders, C. L., Verhoef, J. & Schmitz, F.-J. (2001). Epidemiology and susceptibility of 3,051 *Staphylococcus aureus* isolates from 25 university hospitals participating in the European SENTRY Study. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 3727-3732.
- Fujimura, S., watanabe, A. & Beighton, D. (2001). Characterization of the mupA gene in strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a low level of resistance to mupirocin. *Antimicrobial Agents and Chemoterapy*, 45, 641-642.
- Garau, J. (2008). Other antibiotics of interest in the era of extended-spectrum beta-lactamases: fosfomycin, nitrofurantoin and tigecycline. *Clinical Microbiology and Infections*, 14 suplemento1, 198-202.
- Georgopapadakou, N. H. (1993). Penicillin-binding proteins and bacterial resistance to beta-lactams. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37, 2045-2053.
- Georgopapadakou, N. H. & Liu, F. Y. (1980). Binding of beta-lactam antibiotics to penicillin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus faecalis*: relation to antibacterial activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 18, 834-836.
- Gillespie, M. T., Lyon, B. R., Loo, L. S., Mathhews, P. R., Stewart, P. R. & Skurray, R. A. (1987). Homologous direct repeat sequences associated with mercury, methicillin, tetracycline and trimethoprim resistance in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters*, 43, 165-171.
- Griffeth, G. C., Morris, D. O., Abraham, J. L., Shofer, F. & Rankin, S. C. (2008). Screening for skin carriage of methicillin-resistant coagulase-positive staphylococci and *Staphylococcus schleiferi* in dogs with healthy and inflamed skin. *Veterinary Dermatology*, 19, 142-149.



- Haenni, M., Targant, H., Forest, K., Sévin, C., Tapprest, J., Laugier, C. & Madec, J.-Y. (2010). Retrospective study of necropsy-associated coagulase-positive staphylococci in horses. *Journal of Veterinary diagnostic Investigation*, 22, 953-956.
- Hanselman, B. A., Kruth, S. A., Rousseau, J. & Weese, J. S. (2009). Coagulase positive staphylococcal colonization of humans and their household pets. *The Canadian Veterinary Journal*, 50, 954-958.
- Hartmann, G. R., Heinrich, P., Kollenda, M. C., Skrobranek, B., Tropschug, M. & Weiß, W. (1985). Molecular mechanism of action of the antibiotic rifampicin. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 24, 1009-1014.
- Hooper, D. (2005). Urinary tract agents: nitrofurantoin and methenamide. In G. Mandell, J. Bennet & R. Dolin, *Principles and practice of infectious diseases* (pp. 473-478). Philadelphia: Elsevier.
- Igimi, S., Takahashi, E. & Mitsuoka, T. (1990). *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* subsp. nov., isolated from the external auditory meatus of dogs with external ear otitis. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 40, 409-412.
- Inoue, M., Hashimoto, M. & Mitsuhashi, S. (1970). Mechanism of tetracycline resistance in *Staphylococcus aureus*. I. Inducible resistance to tetracycline. *Journal of Antibiotics*, 23, 68-74.
- Johnson, A. P., Uttley, A. H., Woodford, N. & George, R. C. (1990). Resistance to vancomycin and teicoplanin: an emerging clinical problem. *Clinical Microbiology Reviews*, 3, 280-291.
- Jones, R. D., Kania, S. A., Rohrbach, B. W., Frank, L. A. & Bemis, D. A. (2007). Prevalence of oxacillin-and multidrug-resistant staphylococci in clinical samples from dogs: 1772 samples (2001-05). *Journal of the American Medicine Association*, 230, 221-227.
- Kadlec, K. & Schwarz, S. (2012). Antimicrobial resistance of *Staphylococcus pseudintermedius*. *Veterinary Dermatology*, 23, 276-e55.
- Kadlec, K., Schwarz, S., Perreten, V., Andersson, U. G., Finn, M., Greko, C., . . . Guardabassi, L. (2010). Molecular analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* of feline origin from different European countries and North America. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65, 1826-1828.
- Kadlec, K., van Duijkeren, E., Wagenaar, J. A. & Schwarz, S. (2011). Molecular basis of rifampicin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from dogs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66, 1236-1242.
- Kawakami, T., Shibata, S., Murayama, N., Nagata, M., Nishifuji, K., Iwasaki, T. & Fukata, T. (2010). Antimicrobial susceptibility and methicillin resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* and *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* isolated from dogs with pyoderma in Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 72, 1615-1619.
- Kawano, J., Shimizu, A., Saitoh, Y., Yagi, M., Saito, T. & Okamoto, R. (1996). Isolation of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from chickens. *Journal of Clinical Microbiology*, 34, 2072-2077.

- Kehrenberg, C. & Schwarz, S. (2006). Distributions of florfenicol resistance gene *fexA* and *cfr* among chloramphenicol-resistant staphylococcus isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50, 1156-1163.
- Kehrenberg, C., Schwarz, S., Jacobsen, L., Hansen, L. H. & Vester, B. (2005). A new mechanism for chloramphenicol, florfenicol and clindamycin resistance: methylation of 23S ribosomal RNA at A2503. *Molecular Microbiology*, 57, 1064-1073.
- Keys, K., Hudson, C., Maurer, J. J., Thayer, S., White, D. G. & White, M. D. (2000). Detection of florfenicol resistance genes in *Escherichia coli* isolates from sick chickens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44, 421-424.
- Kirst, H. A., Thompson, D. G. & Nicas, T. I. (1998). Historical yearly usage of vancomycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42, 1303-1304.
- Kotra, L. P., Haddad, J. & Mobashery, S. (2000). Aminoglycosides: perspectives on the mechanism of action and resistance and strategies to counter resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44, 3249-3256.
- Lacey, R. W. (1982). Do sulphonamide-trimethoprim combination select less resistance to trimethoprim than the use of trimethoprim alone? *Journal of Medical Microbiology*, 15, 403-427.
- Landis, J. R. & Koch, G. G. (1977). The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, 33, 159-174.
- Lederberg, J. & Zinder, N. (1948). Concentration of biochemical mutants of bacteria with penicillin. *Journal of the American Chemical Society*, 70, 4267-4268.
- Lentino, J. R., Narita, M. & Yu, V. L. (2008). New antimicrobial agents as therapy for resistant gram-positive cocci. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 27, 3-15.
- Lim, J.-A., Kwon, A.-R., Kim, S.-K., Chong, Y., Lee, K. & Choi, E.-C. (2002). Prevalence of resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin antibiotic in Gram-positive cocci isolated in a Korean hospital. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49, 489-495.
- Lina, G., Quaglia, A., Reverdy, M. E., Leclercq, R., Vandenesch, F. & Etienne, J. (1999). Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides and streptogramins among staphylococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43, 1062-1066.
- Livermore, D. M. (2000). Antibiotic resistance in staphylococci. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 16, suplemento 1: s3-10.
- Livermore, D. M. (2003). Linezolid in vitro: mechanism and antibacterial spectrum. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51, suplemento 2: ii9-ii16.
- Livermore, D. M. (2007). The zeitgeist of resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60, suplemento 1 i59-i61.
- Loeffler, A., Linek, M., Moodley, A., Guardabassi, L., Sung, J. M., Winkler, M., . . . Lloyd, D. H. (2007). First report of multiresistant, *mecA*-positive *Staphylococcus intermedius* in Europe: 12 cases from a veterinary dermatology referral clinic in Germany. *Veterinary Dermatology*, 18, 412-421.

- Luna, V. A., Coates, P., Eady, E. A., Cove, J. H., Nguyen, T. T. & Roberts, M. C. (1999). A variety of gram-positive bacteria carry mobile *mef* genes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 44, 19-25.
- Maaland, M. & Guardabassi, L. (2011). In vitro antimicrobial activity of nitrofurantoin against *Escherichia coli* and *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from dogs and cats. *Veterinary Microbiology*, 151, 396-399.
- Malouin, F. & Bryan, L. (1986). Modification of Penicillin-binding proteins as mechanism of beta-lactam resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 30, 1-5.
- McDermott, P. F., Walker, R. & White, D. G. (2003). Antimicrobials: modes of action and mechanisms of resistance. *International Journal of Toxicology*, 22, 135-143.
- Melancon, P., Tappich, W. E. & Brakier-Gingras. (1992). Single-base mutations at position 2661 at *Escherichia coli* 23S rRNA increase efficiency of translational proofreading. *Journal of Bacteriology*, 174, 7896-7901.
- Melo-Cristino, J., Resina, C., Manuel, V., Lito, L. & Ramirez, M. (2013). First case of infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *The Lancet*, 382, 205.
- Menichetti, F. (2005). Current and emerging serious gram-positive infections. *Clinical Microbiology and Infection*, 11, suplemento 3 22-28.
- Milatovic, D. & Braveny, I. (1987). Development of resistance during antibiotic therapy. *European Journal of Clinical Microbiology*, 6, 234-244.
- Mingeot-Leclercq, M., Glupczynski, Y. & Tulkens, P. (1999). Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43, 727-737.
- Moellering, R. C. (2003). Linezolid: the first oxazolidinone antimicrobial. *Annals of Internal Medicine*, 138, 135-142.
- Moorman, D. R. & Mandell, G. L. (1981). Characteristics of rifampin-resistant variants obtained from clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 20, 709-713.
- Morales, G., Picazo, J. J., Baos, E., Candel, F. J., Arribi, A., Peláez, B., . . . Sánchez-García, M. (2010). Resistance to linezolid is mediated by the *cfr* gene in the first of an outbreak of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Infectious Disease*, 50, 821-825.
- O'Neill, A. J., Larsen, A. R., Henriksen, A. S. & Chopra, I. (2004). A fusidic acid-resistant epidemic strain of *Staphylococcus aureus* carries the *fusB* determinant, whereas *fusA* mutations are prevalent in other resistant isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48, 3594-3597.
- Ogawara, H. (1981). Antibiotic resistance in pathogenic and producing bacteria, with special reference to beta-lactam antibiotics. *Microbiological reviews*, 45, 591-619.
- Olsen, J. E., Christensen, H. & Aarestrup, F. M. (2006). Diversity and evolution of *bla<sub>Z</sub>* from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57, 450-460.
- O'Neill, A. J. & Chopra, I. (2006). Molecular basis of *fusB*-mediated resistance to fusidic acid in *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*, 59, 664-676.

- O'Neill, A. J., McLaws, F., Kahlmeter, G., Henriksen, A. S. & Chopra, I. (2007). Genetic basis of resistance to fusidic acid in staphylococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51, 1737-1740.
- Pedersen, K., Pedersen, K., Jensen, H., Finster, K., Jensen, V. F. & Heuer, O. E. (2007). Occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from diagnostic samples from dogs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60, 775-781.
- Penna, B., Vargas, R., Martins, R., Martins, G. & Lilenbaum, W. (2010). In vitro antimicrobial resistance of staphylococci isolated from canine urinary tract infection. *The Canadian Veterinary Journal*, 51, 738-742.
- Perichon, B., Reynolds, P. & Courvalin, P. (1997). VanD-type glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* BM4339. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41, 2016-2018.
- Perreten, V., Kadlec, K., Schwarz, S., Andersson, U. G., Finn, M., Greko, C., . . . Guardabassi, L. (2010). Clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Europe and North America: an international multicentre study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65, 1145-1154.
- Philippon, A., Arlet, G. & Jacoby, G. A. (2002). Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46, 1-11.
- Pomba, C., Couto, N. & Moodley, A. (2010). Treatment of a lower urinary tract infection in a cat caused by a multidrug methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* and *Enterococcus faecalis*. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 12, 802-806.
- Pomba, C., Hasman, H., Cavaco, L. M., Fonseca, J. D. & Aarestrup, F. M. (2009). First description of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) CC30 and CC398 from swine in Portugal. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 34, 181-195.
- Prescott, J. F., Baggot, J. D. & Walker, R. D. (2000) *Antimicrobial therapy in Veterinary Medicine*. (3th ed.) Iowa: Iowa state press.
- Ramsey, M. A., Bradley, S. F., Kauffman, C. A. & Morton, T. M. (1996). Identification of chromosomal location of mupA gene, encoding low-level mupirocin resistance in staphylococcal isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40, 2820-2823.
- Rich, M. (2005). Staphylococci in animals: prevalence, identification and antimicrobial susceptibility with an emphasis on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *British Journal of Biomedical Science*, 62, 98-105.
- Richmann, N. & Bodley, J. W. (1972). Ribosomes cannot interact simultaneously with elongation factors EF Tu and EF G. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 686-689.
- Roberts, M. C. (2006). Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiology Letters*, 245, 195-203.
- Roberts, M. C., Sutcliffe, J., Courvalin, P., Jensen, L. B., Rood, J. & Seppala, H. (1999). Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43, 2823-2830.

- Rolinson, G. N. (1998). Forty years of beta-lactam research. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 41, 589-603.
- Roth, B., Falco, E. A., Hitchings, G. H. & Bushby, S. R. (1962). 5-benzyl-2,4-diaminopyrimidines as antibacterial agents. I. Synthesis and antibacterial activity in vitro. *Journal of Medicinal and Pharmaceutical Chemistry*, 91, 1103-1123.
- Ruscher, C., Lubke-Becker, A., Wleklinski, C. G., Soba, A., Wieler, L. H. & Walther, B. (2009). Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from clinical samples of companion animals and equidae. *Veterinary Microbiology*, 136, 197-201.
- Sampimon, O. C., Lam, T. J., Mevius, D. J., Schukken, Y. H. & Zadoks, R. N. (2011). Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine milk samples. *Veterinary Microbiology*, 150, 173-179.
- Sandegren, L., Lindqvist, A., Kahlmeter, G. & Andersson, D. I. (2008). Nitrofurantoin resistance mechanism and fitness cost in *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62, 495-503.
- Savini, V., Barbarini, D., Polakowska, K., Gherardi, G., Bialecka, A., Kasproicz, A., . . . Carretto, E. (2013). Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in a bone marrow transplant recipient. *Journal of Clinical Microbiology*, 51, 1636-1638.
- Schmitz, F. J., Sadurski, R., Kray, A., Boss, M., Geisel, R., Kohrer, K., . . . Fluit, A. C. (2000). Prevalence of macrolide resistance genes in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium* isolates from 24 European university hospitals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 45, 921-923.
- Schnappinger, D. & Hillen, W. (1996). Schnappinger, D., and W. Hillen. 1996. Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms. *Archives of Microbiology*, 165, 359-369.
- Schwarz, S. & Chaslus-Dancla, E. (2001). Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Veterinary Research*, 32, 201-225.
- Schwarz, S., Kehrenberg, C., Doublet, B. & Cloeckert, A. (2004). Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiology reviews*, 28, 519-542.
- Schwarz, S., Werckenthin, C. & Kehrenberg, C. (2000). Identification of a plasmid-borne chloramphenicol-florfenicol resistance gene in *Staphylococcus sciuri*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44, 2530-2533.
- Shah, M. & Mohanraj, M. (2003). High levels of fusidic acid-resistant *Staphylococcus aureus* in dermatology patients. *British Journal of Dermatology*, 148, 1018-1020.
- Shinabarger, D. & Eliopoulos, G. M. (2009). Resistance to linezolid. *Antimicrobial Drug Resistance Infectious Disease*, 247-257.
- Sköld, O. (2000). Sulfonamide resistance: mechanisms and trends . *Drug Resistance Updates*, 3, 155-160.
- Sousa, J. C. (2006). *Manual de antibióticos antibacterianos (2ª edição)*. Porto: edições Universidade Fernando Pessoa.

- Speer, B. S., Bedzyk, L. & Salyers, A. A. (1991). Evidence that a novel tetracycline resistance gene found on two bacteroides transposons encodes an NADP-requiring oxidoreductase. *Journal of Bacteriology*, 173, 176-183.
- Speer, B. S., Shoemaker, N. B. & Salyers, A. A. (1992). Bacterial resistance to tetracycline: mechanism, transfer and clinical significance. *Clinical Microbiology Reviews*, 5, 387-399.
- Stegmann, R., Burnens, A., Maranta, C. A. & Perreten, V. (2010). Human infection associated with methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* ST71. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65, 2047-2048.
- Sutherland, R., Boon, R. J., Griffin, K. E., Masters, P. J., Slocombe, E. & White, A. R. (1985). Antibacterial activity of mupirucin (pseudomonic acid), a new antibiotic for topical use. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 27, 495-498.
- Toh, S.-M., Xiong, L., Arias, C. A., Villegas, M. V., Lolans, K., Quinn, J. & Mankin, A. S. (2007). Acquisition of a natural resistance gene renders a clinical strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* resistant to the synthetic antibiotic linezolid. *Molecular Microbiology*, 64, 1506-1514.
- Tsiodras, S., Gold, H. S., Sakoulas, G., Eliopoulos, G. M., Wennersten, C., Venkataraman, L., . . . Ferraro, M. J. (2001). Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *The Lancet*, 358, 207-208.
- Turnidge, J. & Collignon, P. (1999). Resistance to fusidic acid. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 12, suplemento 2: S35-S44.
- van Duijkeren, E., Catry, B., Greko, C., Moreno, M. A., Pomba, M. C., Pyörälä, S., . . . Törneke, K. (2011). Review on methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66, 2705-2714.
- Vanni, M., Tognetti, R., Pretti, C., Crema, F., Soldani, G., Meucci, V. & Intorre, L. (2009). Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus schleiferi* isolated from dogs. *research in Veterinary Science*, 87, 192-195.
- Verbist, L. (1990). The antimicrobial activity of fusidic acid. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 25, suplemento B: 1-5.
- Weese, J. S. (2005). Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging pathogen in small animals. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 41, 150-157.
- Weese, J. S. & van Duijkeren, E. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. *Veterinary Microbiology*, 140, 418-429.
- Wehrli, W. (1983). Rifampin: mechanisms of action and resistance. *Clinical Infectious Diseases*, 5, suplemento 3: S407-S411.
- Werckenthin, C., Cardoso, M., Martel, J. L. & Schwarz, S. (2001). Antimicrobial resistance in staphylococci from animals with particular reference to bovine *Staphylococcus aureus*, porcine *Staphylococcus hyicus*, and canine *Staphylococcus intermedius*. *Veterinary Research*, 32, 341-362.

- Westh, H., Hougaard, D. M., Vuust, J. & Rosdahl, V. T. (1995). *erm* genes in erythromycin-resistant *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *APMIS*, 103, 225-232.
- Willey, J., Sherwood, L. M. & Woolverton, C. J. (2008). In *Prescott, Harley and Klein's Microbiology*. (7th. ed.). New York, NY: McGraw Hill.
- Witte, W. & Klare, I. (1999). Antibiotikaresistenz bei bakteriellen infektionserregern: mikrobiologisch-epidemiologische aspekte. *Bundesgesundheitsblatt – Gesundheitsforschung – Gesundheitsschutz*, 42, 8-16.
- Zhanel, G., Walkty, A., Vercaigne, L., Karlowsky, J. A., Embil, J., Gin, A. S. & Hoban, D. J. (1999). The new fluoroquinolones: a critical review. *Canadian Journal of Infectious Diseases*, 10, 207-238.

## Anexo 1 – Resumo aceite no 3<sup>rd</sup> ASM-ESCMID Conference on Methicillin-resistant Staphylococci in Animals: Veterinary and Public Health Implications

### **Trends in antimicrobial resistance in clinical staphylococci isolated from companion animals over a 8-year period**

Claudia Monchique<sup>1</sup>, Natacha Couto<sup>1</sup>, Adriana Belas<sup>1</sup>, Luís T. Gama<sup>1</sup>, Constança Pomba<sup>1</sup>

<sup>1</sup>CIISA, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa (FMV-UL);

Staphylococci are a group of bacteria with clinical, agricultural, and economic importance because of their ability to become resistant to antimicrobials. This alarming feature should be considered and antimicrobial susceptibility testing (AST) is important to monitor the spread of resistant organisms/genes and the rise of multidrug-resistant staphylococci.

The aim of this study was to investigate the evolution of *Staphylococcus* spp. resistance to antibiotics between 1999-2006. The 384 clinical samples were received by the Laboratory of Clinical Analysis of the FMV-UL and were obtained from various animal species admitted to several hospitals in the Lisbon's district. AST was performed by disk diffusion using 26 antibiotics (AB). Staphylococcal species were identified by PCR amplification of the respective *nuc* gene and by 16S rRNA sequencing. The *mecA* and *mecC* genes were screened by PCR. Statistical analyses were performed using SAS 9.3 and differences were considered relevant if  $P \leq 0.05$ .

In total, 251 isolates were resistant to at least 1 AB (65.36%), with higher frequencies of resistance to penicillin and ampicillin (53.13%) followed by tetracycline (31.77%). Overall, 75 isolates (19.53%) were multidrug resistant and only 34.64 % of the isolates were susceptible to all the AB tested. Resistance increased over time, with the highest level observed in 2006 (79.55%). The highest resistance to 1 AB was found in *S. aureus* and *S. pseudintermedius* (nearly 73% of the isolates)

followed by coagulase-negative staphylococci (CNS) and *S. schleiferi* (about 49%). Eleven CNS were resistant to oxacilin, but only 8 were *mecA*-positive. One *S. aureus* had the *mecA* gene and was cefoxitin-resistant. When compared to dogs, cats had lower odds to have a resistant isolate ( $P=0.001$ ,  $OR=0.307$ ,  $[0.152-0.619]$ ) and a CNS resistant to at least 1 AB ( $P=0.004$ ,  $OR=0.170$ ,  $[0.051-0.560]$ ). *S. pseudintermedius* originating from otitis had higher odds of being resistant to at least 1 AB than those from pyoderma ( $P=0.013$ ,  $OR=0.452$ ,  $[0.241-0.845]$ ).

Our results confirmed that antimicrobial resistance is very frequent in staphylococci, and the presence of methicillin-resistant staphylococci in sick animals highlights the importance of horizontal transfer of different *SCCmec* elements and might favor the transmission of resistance genes from staphylococci present in animals to those from humans. Changes in antibiotic resistance require continuous monitoring for adjustment of antimicrobial strategy.

Anexo 2 – Distribuição dos isolados que compõem o grupo de estafilococos coagulase-negativo (ECN).

Estirpe	Frequência
<i>Staphylococcus</i> spp.	26
<i>Staphylococcus simulans</i>	16
<i>Staphylococcus felis</i>	8
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	6
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	3
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	2
<i>Staphylococcus capitis</i>	1
<i>Staphylococcus conhi conhi</i>	1
<i>Staphylococcus conhi urealyticum</i>	1
<i>Staphylococcus lentus</i>	1
<i>Staphylococcus sciuri</i>	1
<b>Total</b>	<b>66</b>





Anexo 3 – Percentagens de isolados suscetíveis e de isolados resistentes aos diferentes antibióticos estudados ao longo dos anos.

	P		AMP		AMC		KF		FOX		CTX		CRO		CVN		OX	
Ano	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R
1999	68.75	31.25	68.75	31.25	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	93.75	6.25	100.00	0.00	93.75	6.25
2000	37.50	62.50	37.50	62.50	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00
2001	49.02	50.98	49.02	50.98	98.04	1.96	100.00	0.00	96.08	3.92	98.04	1.96	98.04	1.96	98.04	1.96	98.04	1.96
2002	50.77	49.23	50.77	49.23	96.92	3.08	100.00	0.00	92.31	7.69	95.38	4.62	93.85	6.15	93.85	6.15	93.85	6.15
2003	55.26	44.74	55.26	44.74	100.00	0.00	100.00	0.00	98.68	1.32	100.00	0.00	97.37	2.63	97.37	2.63	100.00	0.00
2004	38.33	61.67	38.33	61.67	96.67	3.33	100.00	0.00	96.67	3.33	98.33	1.67	95.00	5.00	95.00	5.00	98.33	1.67
2005	40.00	60.00	40.00	60.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00
2006	40.91	59.09	40.91	59.09	95.45	4.55	100.00	0.00	95.45	4.55	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	93.18	6.82

	ENR		CIP		LEV		NOR		OFX		MXF		TE		F		C		FFC	
Ano	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R
1999	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	68.75	31.25	100.00	0.00	93.75	6.25	100.00	0.00
2000	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	56.25	43.75	100.00	0.00	93.75	6.25	100.00	0.00
2001	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	72.55	27.45	100.00	0.00	92.16	7.84	100.00	0.00
2002	95.38	4.62	93.85	6.15	92.31	7.69	92.31	7.69	90.77	9.23	95.38	4.62	67.69	32.31	100.00	0.00	98.46	1.54	100.00	0.00
2003	97.37	2.63	98.68	1.32	97.37	2.63	94.74	5.26	96.05	3.95	97.37	2.63	73.68	26.32	98.68	1.32	97.37	2.63	100.00	0.00
2004	98.33	1.67	96.67	3.33	96.67	3.33	98.33	1.67	96.67	3.33	98.33	1.67	65.00	35.00	96.67	3.33	98.33	1.67	100.00	0.00
2005	96.36	3.64	96.36	3.64	100.00	0.00	96.36	3.64	98.18	1.82	100.00	0.00	67.27	32.73	100.00	0.00	96.36	3.64	100.00	0.00
2006	93.18	6.82	93.18	6.82	93.18	6.82	93.18	6.82	93.18	6.82	95.45	4.55	63.64	36.36	100.00	0.00	97.73	2.27	100.00	0.00

AMP – ampicilina; AMC – amoxicilina/ácido clavulânico; C – cloranfenicol; CIP – ciprofloxacina; CRO – ceftriaxona; CTX – cefotaxima; CVN – cefovecina; ENR – enrofloxacinina; F – nitrofurantoína; FFC – florfenicol; FOX – ceftioxitina; KF – cefalotina; LEV – levofloxacina; MXF – moxifloxacina; NOR – norfloxacina; OX – oxacilina; P-  
penicilina; TE – tetraciclina

Anexo III (continuação) – Percentagem de isolados suscetíveis e de isolados resistentes aos diferentes antibióticos estudados ao longo dos anos.

Ano	CN		NET		TOB		AK		N		S		K		E		DA	
	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R
1999	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	87.50	12.50	87.50	12.50	68.75	31.25	81.25	18.75
2000	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	75.00	25.00	68.75	31.25	68.75	31.25	56.25	43.75	62.50	37.50
2001	98.04	1.96	100.00	0.00	98.04	1.96	98.04	1.96	84.31	15.69	84.31	15.69	86.27	13.73	86.27	13.73	92.16	7.84
2002	93.85	6.15	100.00	0.00	93.85	6.15	96.92	3.08	89.23	10.77	63.08	36.92	86.15	13.85	86.15	13.85	89.23	10.77
2003	98.68	1.32	100.00	0.00	100.00	0.00	97.37	2.63	84.21	15.79	81.58	18.42	82.89	17.11	86.84	13.16	88.16	11.84
2004	100.00	0.00	100.00	0.00	98.33	1.67	96.67	3.33	86.67	13.33	80.00	20.00	78.33	21.67	83.33	16.67	85.00	15.00
2005	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	92.73	7.27	89.09	10.91	87.27	12.73	85.45	14.55	87.27	12.73
2006	95.45	4.55	100.00	0.00	95.45	4.55	100.00	0.00	90.91	9.09	86.36	13.64	86.36	13.64	86.36	13.64	86.36	13.64

Ano	FD		MUP		TEC		SXT		W		S3		LZD		QD		RD	
	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R
1999	87.50	12.50	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	68.75	31.25	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00
2000	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00	62.50	37.50	100.00	0.00	100.00	0.00	93.75	6.25
2001	94.12	5.88	100.00	0.00	100.00	0.00	96.08	3.92	84.31	15.69	62.75	37.25	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00
2002	95.38	4.62	93.85	6.15	100.00	0.00	81.54	18.46	69.23	30.77	47.69	52.31	95.38	4.62	98.46	1.54	95.38	4.62
2003	96.05	3.95	100.00	0.00	100.00	0.00	97.37	2.63	90.79	9.21	55.26	44.74	100.00	0.00	98.68	1.32	97.37	2.63
2004	90.00	10.00	93.33	6.67	100.00	0.00	98.33	1.67	90.00	10.00	48.33	51.67	100.00	0.00	98.33	1.67	96.67	3.33
2005	94.55	5.45	98.18	1.82	100.00	0.00	100.00	0.00	87.27	12.73	43.64	56.36	100.00	0.00	98.18	1.82	100.00	0.00
2006	90.91	9.09	97.73	2.27	100.00	0.00	97.73	2.27	84.09	15.91	54.55	45.45	100.00	0.00	100.00	0.00	100.00	0.00

AK - amicacina; CN – gentamicina; DA – clindamicina; E – eritromicina; FD – ácido fusídico; K – canamicina; MUP – mupirocina; N – neomicina; NET – netilmicina; QD – quinupristina/dalfopristina; RD – rifampicina; S – estreptomicina; SXT – trimetoprim/sulfametoxazole; S3 – sulfonamidas; TEC – teicoplanina; TOB – tobramicina; W – trimetoprim

Anexo 4 – Coeficiente de correlação de Kendall para os grupos de antibióticos testados.

	K	E	DA	N	S
K	-	0.73	0.68	0.75	0.69
E	-	-	0.89	0.61	0.61
DA	-	-	-	0.60	0.55
N	-	-	-	-	0.64
S	-	-	-	-	-

DA – clindamicina; E – eritromicina; K – canamicina; N – neomicina; S - estreptomicina

	AMP	P	TE
AMP	-	1	0.30
P	-	-	0.30
TE	-	-	-
	SXT	S3	W
SXT	-	0.09	0.43
S3	-	-	0.22
W	-	-	-

AMP - ampicilina; P – penicilina; SXT – sulfametoxazole/trimetoprim; S3 – sulfonamidas; TE – tetraciclina;  
W – trimetoprim

	LEV	CIP	ENR	NOR	OFX	MXF
LEV	-	0.66	0.60	0.73	0.81	0.79
CIP	-	-	0.87	0.81	0.73	0.49
ENR	-	-	-	0.76	0.68	0.51
NOR	-	-	-	-	0.79	0.60
OFX	-	-	-	-	-	0.60
MXF	-	-	-	-	-	-

CIP – ciprofloxacina; ENR – enrofloxacin; LEV – levofloxacina; MXF – moxifloxacina; NOR – norfloxacina;  
OFX – ofloxacina